



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE PESCA
E ASUNTOS MARÍTIMOS



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INSTITUTO DE ACUICULTURA

TESIS DOCTORAL

**Estudio de las toxinas DSP producidas por los dinoflagelados de
las Rías Gallegas y de sus transformaciones en los moluscos.**

Gestión y mitigación de los episodios tóxicos.

Memoria presentada por

M^a Luisa Fernández Cañamero

para optar al grado de Doctora en Química

2007

PORTADA: Arrastre de fitoplancton dominado por *Dinophysis acuta* (Ría de Pontevedra). Fotografía cedida por gentileza de Yolanda Pazos del INTECMAR.

El doctor Juan Blanco Pérez, investigador del Centro de Investigacións Mariñas de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos (Xunta de Galicia),

CERTIFICA

Que el trabajo titulado “Estudio de las toxinas DSP producidas por los dinoflagelados de las Rías Gallegas y de sus transformaciones en los moluscos. Gestión y mitigación de los episodios tóxicos”, que presenta D^a Maria Luisa Fernández Cañamero para optar al grado de Doctora en Química, ha sido realizado bajo su dirección y, considerándolo concluido, autoriza su presentación a fin de que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Vilanova de Arousa, 25 de Abril de 2007

Fdo. Dr. Juan Blanco Pérez
Director de la tesis
CIMA

Fdo. Dr. Oscar García Martín
Tutor de la tesis
USC

La doctoranda

Fdo. Maria Luisa Fernández Cañamero

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Sanidad Exterior de Vigo del Ministerio de Administraciones Públicas, y dio lugar a las siguientes publicaciones:

- 1) From *Dinophysis* spp toxicity to DSP outbreaks: a preliminary model of toxin accumulation in mussels. 1995. Blanco, J., **Fernández, M.L.**, Mariño, J., Reguera, B., Míguez, A., Maneiro, J., Cacho, E. and Martínez, A. In: P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien and C. Marcaillou (eds). Harmful Marine Algal Blooms, Lavoisier, Intercept Ltd, Paris, pp. 777-82.
- 2) Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from the Galician Rías Bajas. 2001. **Fernández, M.L.**, Reguera, B., Ramilo, I. and Martinez, A. In: G.M. Hallegraeff, S.I. Blackburn, C.J. Bolch and R.J. Lewis (eds). Harmful Algal Blooms, IOC of UNESCO, pp. 360-3.
- 3) Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain). 2001. Bravo, I., **Fernández, M.L.**, Ramilo, I. and Marínez, A. Toxicon, 39: 1537-45.
- 4) First report of PTX-2 in phytoplankton net hauls and mussels from the Galician Rías Bajas during proliferations of *Dinophysis acuta* and *D. caudata*. 2003. **Fernández, M.L.**, Míguez, A., Martínez, A., Morono, A., Arévalo, F., Pazos, Y., Salgado, C., Correa, J., Blanco, J., González-Gil, S. and Reguera, B. In: A. Villalba, B. Reguera, J.L. Romalde and R. Beiras (eds). Molluscan Shellfish Safety, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, pp. 75-83.
- 5) Pectenotoxin 2 in single cells isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rias (NW Spain). 2006. **Fernández, M.L.**, Reguera, B., Gonzalez-Gil, S. and Míguez, A. Toxicon, 48: 477-490.
- 6) Okadaic acid depuration in the mussels *Mytilus galloprovincialis*: one and two compartment models and the effect of environmental conditions. 1999. Blanco, J., Fernández M.L., Míguez, A. and Morono, A. Mar. Ecol. Prog. Ser., 176: 153-63.

- 7) Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. 1996. **Fernández, M.L.**, Míguez, A., Cacho, E. and Martínez, A. *Toxicon*, 34: 381-7
- 8) Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain. 1998. **Fernández, M.L.**, Míguez, A., Moróño, A., Cacho, E., Martínez, A. and Blanco, J. In: B., Reguera, J., Blanco, M.L., Fernández and T. Wyatt (eds). *Harmful Algae*, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 449-52
- 9) Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*. 2003. Moróño, A., Arévalo, F., **Fernández, M.L.**, Maneiro, J., Pazos, Y., Salgado, C. and Blanco, J. *Aquatic Toxicology*, 62: 269-80
- 10) *In vivo* assays for phycotoxins. 2003. **Fernández, M.L.**, Richard, D.J.A. and Cembella, A. D. In: Hallegraeff, G.M., Cembella, A.D. and Anderson, D.M., (eds.). *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Paris. UNESCO Publishing, pp. 347-380
- 11) Management of shellfish resources. 2003. **Fernández, M.L.**, Shumway, S. and Blanco, J. In: Hallegraeff, G.M., Cembella, A.D. and Anderson, D.M., (eds.). *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Paris. UNESCO Publishing, pp 657-692.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis culmina una etapa de mi vida que fue fundamental en mi formación y crecimiento profesional y personal. Distanciada ahora de las batas blancas, del ruido de los rota-vapores y de los aromas del laboratorio y embarcada en la frenética “gestión”, he echado de menos en muchas ocasiones aquel mundo conocido y familiar ligado a las toxinas marinas que, si bien estuvo lleno de esfuerzos, desafíos y alguna que otra desilusión, también lo estuvo de descubrimientos, alegrías, viajes exóticos y, sobre todo, de grandes amigos y profundos afectos, algunos de los cuales, afortunadamente, todavía están muy presentes en mi vida.

Aunque dejar el Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas fue un acto voluntario, resultó un proceso difícil y hasta doloroso, tanto por lo que abandonaba o perdía, como por lo desconocido y difícil que se me revelaba mi nuevo trabajo en el Centro Tecnológico del Mar. Por suerte, CETMAR ha traído a mi vida nuevos amigos, ilusiones y retos e, instalada y ya más familiarizada en el “control y gestión del medio y de los recursos marinos”, se ha ido atenuando la nostalgia, de manera que esta tesis me reconcilia con ese pasado y me refuerza en mi actual carrera profesional.

Llegado el momento de las menciones y agradecimientos, tengo que hablar de mis compañeros de “Sanidad” y antes de nadie, de Aurea Míguez (Auri), mi gran amiga-hermana con la que compartí tanto en aquellos años y con la que ahora me gustaría compartir esta tesis que es también suya, por el esfuerzo, inteligencia, coraje y alegría que aportó en aquel tiempo para realizar juntas una gran parte de estos trabajos.

Del laboratorio de Sanidad me gustaría mencionar con mucho cariño a Ana Martínez con la que sigo vinculada por proyectos profesionales y estrechos lazos familiares y a Emiliano Cacho. Con ellos compartí también muchos trabajos, esfuerzos y alegrías. También a Justa y a Viki, dos magníficas personas y buenas amigas, a Leo, a Mati, a Javier y a Leandro.

Del IEO, la lista de buenos amigos es también grande: Beatriz Reguera, que me mantuvo cerca de las toxinas marinas en estos últimos años, me animó en los momentos bajos con

estimulantes y valiosos comentarios y con la que realicé muchos de estos trabajos; Pepe Franco, siempre tan generoso con sus muchos conocimientos y experiencia y siempre

dispuesto a echar una mano, Isabel Bravo con la que pude descubrir la generosa producción de toxinas por parte de sus cuidadas cepas de *Prorocentrum lima*, Santi Fraga y Sonsoles González-Gil.

Del antiguo Centro de Control de Calidad del Medio Marino (hoy INTECMAR) a Covadonga Salgado, Yolanda Pazos, Fabiola Arévalo, Juan Maneiro y Angeles Morono, ejemplares en su ilusión y dedicación y con los que también he compartido trabajos.

Del CIMA, Antonio Villalba, con el que tuve la suerte y el placer de compartir la organización de la Conferencia Internacional de Salubridad de los Moluscos en Santiago de Compostela en el 2002 (risas y lágrimas incluidas) y, por supuesto, Juan Blanco, mi apreciado director de tesis, con el espero embarcarme en unas cuantas aventuras más.

De la Universidad de la Laguna, Manolo Norte, tan querido también e inspirador de trabajos y esfuerzos y Javier Fernández, con los que he tenido la alegría de seguir trabajando en otros proyectos posteriores.

De CETMAR, a todos mis compañeros por su apoyo y a Gonzalo Borrás por su valiosa ayuda en la edición de la tesis.

Fuera de España, fueron muchos los maestros y amigos que me inspiraron. Mi más sincero agradecimiento al Profesor Takeshi Yasumoto, que me ayudó en mi andadura internacional y que fue siempre tan generoso y cercano; mi recuerdo a los entrañables colegas de la red de laboratorios europeos de referencia y a una lista enorme de amigos de muchas partes del mundo que llenaron aquellos años de color, alegría y descubrimientos.

Y ahora llega el tiempo de hablar de los más cercanos e inevitablemente más “damnificados” por los esfuerzos. De Nano, mi marido, que siempre me ha dado fuerza con su energía y entusiasmo natural y que fue el innovador autor de los fondos de mis primeras presentaciones en power point en foros internacionales, y de mis hijos, Santi, Luis y Silvia, que han tenido que soportar fin de semana tras fin de semana, en esta largas travesías por el desierto en las

que a veces se convierten las tesis, la imagen de su madre echando humo delante del ordenador, haciendo a menudo caso omiso a sus demandas de tiempo, atención, juegos, y meriendas. Quizás el tiempo no dedicado a los más queridos es lo que nunca compensa y por supuesto no se recupera, pero somos así de ciegos los que nos apasionamos con el trabajo.

Por último, me gustaría dedicar esta tesis a mi padre, que se fue tan pronto, y que fue durante mis primeros 16 años de vida mi estímulo para los esfuerzos académicos, a mis hermanos y a mi magnífica madre, siempre tan combativa, positiva, generosa y estimulante.

ABREVIATURAS

ADAM	9-Antril-diazometano
AMP	Adenosina monofosfato
AO	Acido okadaico
APCI	Ionización química a presión atmosférica
API	Ionización a presión atmosférica
ASP	Intoxicación amnésica por bivalvos
BAP	Bromoacetil-pireno
DSP	Intoxicación diarreica por bivalvos
DTXs	Dinofisistoxinas
DTX1	Dinofisistoxina-1
DTX2	Dinofisistoxina-2
DTX3	Dinofisistoxina-3
DTX4	Dinofisistoxina-4
DTX5	Dinofisistoxina-5
ELISA	Inmunoensayos enzimáticos en fase sólida
ESI	Electro spray
FDP	Fluoresceína difosfato
FIA	Inmunoensayos fluorescentes
FMUP	Metilumbeliferona fosfato
HPLC-FD	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia acoplada a Detección Fluorimétrica
HPLC-MS	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia acoplada a Espectrometría de Masas
KB	Carcinoma epidérmico humano
LOAEL	Nivel más bajo con efecto adverso observado
MTT	Colorante de tetrazolio
NOAEL	Nivel sin efecto adverso observado
NSP	Intoxicación neurotóxica por bivalvos
PDE:	Fosfodiesterasas
PP2A	Protein fosfatasas
PSP	Intoxicación paralizante por bivalvos
PTX2SA	Seco-ácido de la pectenotoxina-2
PTX2	Pectenotoxina 2
PTXs	Pectenotoxinas

RIA	Radioinmunoensayos
YTXs	Yesotoxinas

ÍNDICE

ÍNDICE

• Introducción.....	5
○ Consideraciones generales.....	7
○ Toxinas y especies fitoplanctónicas asociadas al fenómeno DSP.....	10
○ Epidemiología y toxicología de las toxinas DSP.....	18
○ Métodos de detección de las toxinas DSP.....	22
○ Acumulación, transformación y eliminación de las toxinas DSP.....	35
○ Gestión y mitigación de los episodios tóxicos.....	50
• Objetivos.....	61
• Desarrollo de la tesis.....	65
• Capítulo I: Toxinas y dinoflagelados responsables de los episodios de toxicidad DSP en las Rias Gallegas.....	71
• Capítulo II: Acumulación, transformación y eliminación de las toxinas DSP en los moluscos.....	155
• Capítulo III: Bioensayos para la detección de toxinas marinas.....	225
• Capítulo IV: Gestión y mitigación de los episodios tóxicos.....	273
• Conclusiones generales.....	321
• Perspectivas.....	327
• Referencias.....	329

INTRODUCCIÓN

1. CONSIDERACIONES GENERALES

La presencia de biotoxinas en alimentos de origen marino, principalmente en moluscos, representa un grave problema sanitario y económico de extensa incidencia geográfica, y que afecta tanto a países industrializados como a países en desarrollo. La transferencia y acumulación de estas toxinas, producidas por un reducido número de especies de dinoflagelados y diatomeas, tiene lugar a través de las redes tróficas. Los principales vectores de transmisión al hombre son los moluscos bivalvos y, en el caso de la ciguatera, algunas especies de peces de zonas intertropicales. Asimismo, diferentes especies de gasterópodos y crustáceos pueden actuar como transvectores.

Las biotoxinas marinas comprenden un amplio espectro de sustancias de estructura molecular, mecanismo de acción y actividad biológica muy diversa y pueden clasificarse de diversas formas, aunque la clasificación más extendida se basa en sus diferentes efectos toxicológicos. Basándose en la sintomatología de la intoxicación, se han definido diversos síndromes relacionados con las siguientes toxinas:

- Toxinas paralizantes de los mariscos, asociadas al síndrome “Paralytic Shellfish Poisoning” (PSP);
- Toxinas diarreicas de los mariscos, asociadas al síndrome “Diarrhetic Shellfish Poisoning” (DSP);
- Toxinas amnésicas de los mariscos, asociadas al síndrome “Amnesic Shellfish Poisoning” (ASP);
- Toxinas neurotóxicas de los mariscos, asociadas al síndrome “Neurotoxic Shellfish Poisoning ” (NSP);
- Toxinas ciguatéricas, asociadas al síndrome “Ciguatera Fish Poisoning” (CFP);
- Azáspirácidos, asociados al síndrome “Azaspiracid Poisoning” (AZP), que se manifiesta con síntomas muy similares al envenenamiento diarreico (DSP).

Dentro de los síndromes mencionados anteriormente, el tradicionalmente denominado “DSP” se manifiesta como una intoxicación intestinal producida por la ingestión de moluscos contaminados con toxinas de naturaleza polietérea, producidas por dinoflagelados planctónicos pertenecientes al género *Dinophysis* o por ciertos dinoflagelados bentónicos del género *Prorocentrum*. Tras la ingestión de los moluscos contaminados, y después de un periodo de incubación que oscila entre treinta minutos y varias horas, aparece la sintomatología típica, caracterizada por diarrea, náuseas, dolor abdominal y vómitos. En la

mayor parte de los casos, las víctimas se recuperan en un periodo no superior a tres días, no existiendo registros de víctimas mortales del síndrome.

Los primeros registros de intoxicaciones gastrointestinales asociadas al consumo de moluscos expuestos a dinoflagelados proceden de Holanda y se remontan a los años 60 (Kat 1979). En 1976 y 1977, se produjeron en Japón intoxicaciones similares asociadas al consumo de mejillones y vieiras. Los estudios japoneses (Yasumoto *et al.*, 1978, 1979, 1980a) revelaron una estrecha correlación entre el dinoflagelado *Dinophysis fortii* y las intoxicaciones, de manera que la toxina se denominó dinophysistoxina (DTX) y el síndrome se denominó “Diarrhetic Shellfish Poisoning” (DSP) (Yasumoto *et al.*, 1980^a, 1984). Estudios posteriores demostraron la responsabilidad de otras especies del mismo género como son *D. acuminata*, *D. acuta* y *D. norvegica* en este tipo de episodios así como la posible implicación del género *Prorocentrum* (Yasumoto *et al.*, 1980b, Lee *et al.*, 1989a).

Aunque con posterioridad a las primeras intoxicaciones en Holanda y Japón, se han registrado episodios de la misma naturaleza en numerosas partes del mundo, Europa y Japón son sin duda las zonas más afectadas por este tipo de toxicidad algal que, si bien no es letal, da lugar a prolongados periodos de prohibición de captura o recogida de los moluscos en las zonas de producción, con el consecuente daño económico para los sectores relacionados con el recurso.

En las Rías Gallegas, que son zonas de una elevada producción marisquera, estos episodios tóxicos constituyen un fenómeno relativamente frecuente que interfiere y altera notablemente las distintas fases de la estrategia de explotación empleada por el sector marisquero y acuicultor, fundamentalmente debido a las prohibiciones de extracción que es preciso establecer cuando los niveles de toxinas acumuladas en los moluscos sobrepasan los límites legalmente establecidos. La repercusión de estos episodios es clara si se tiene en cuenta que el sector de la acuicultura de moluscos, especialmente el cultivo de mejillón, es estratégico en Galicia, donde esta especie constituye el primer producto del mar por volumen de desembarcos, con unas importantes implicaciones económicas y sociales. El número de unidades de producción (bateas) instalado es de 3537 y, aunque el número y longitud de cuerdas de cultivo por vivero está limitado, la producción anual se sitúa en torno a las 260000 t. El empleo directo generado por el cultivo oscila entre las 9000 y las 13000 personas según la época del año. En total, contemplando los puestos de trabajo generados en industrias derivadas de este cultivo tales como conserveras, depuradoras, astilleros, transporte,

cocederos, industrias auxiliares, etc, el empleo total del sector mejillonero en Galicia sobrepasa las 20.000 personas.

La prevención de los riesgos para la salud pública y del impacto sobre la explotación de los recursos marinos ha llevado a la implantación de programas de control y manejo de los episodios tóxicos. Las áreas cubiertas en dichos programas varían dependiendo de las regiones ó países y, de manera general, incluyen como objetivos la vigilancia y el seguimiento de las microalgas potencialmente tóxicas en las aguas de producción, el control de la presencia de biotoxinas en los diferentes vectores de transmisión y la comparación de los niveles detectados con los límites establecidos en la legislación con el objeto de tomar decisiones en cuanto a la extracción y puesta en el mercado de los productos marinos.

Adicionalmente, y ligado a la importancia económica del recurso en el área de estudio, algunos programas contemplan estrategias encaminadas a la protección del recurso de cara a minimizar los graves impactos ocasionados por estos episodios en los sectores productores.

Para optimizar el cumplimiento de los objetivos mencionados anteriormente, además de conocer las especies tóxicas y las toxinas producidas por las mismas, resulta de crucial importancia adquirir capacidad de predicción de la iniciación, duración y desaparición de los episodios tóxicos. Para ello, además de monitorizar parámetros oceanográficos (temperatura, salinidad, nutrientes, pigmentos) y condiciones meteorológicas (vientos, aportes fluviales) que permitan establecer una red de alerta temprana de los episodios tóxicos, es importante adquirir conocimiento sobre los procesos de transformación que sufren las toxinas en los moluscos así como la cinética de depuración o eliminación de las mismas. Todo ello encaminado a predecir la duración de los episodios y por tanto al establecimiento de las estrategias más adecuadas de producción y comercialización.

En lo que se refiere a la gestión de los episodios tóxicos, además del abordaje de los aspectos de monitorización y control, es de vital relevancia el acometer estudios de mitigación de sus efectos, mediante la identificación y propuesta de posibles sistemas de manejo que permitan minimizar la acumulación de toxinas o propicien su eliminación.

En el caso de las toxinas asociadas históricamente al síndrome diarreico DSP y que son el objeto principal de esta tesis doctoral, el establecimiento de un programa que aborde los objetivos mencionados anteriormente no es una tarea sencilla. El desarrollo de conocimiento asociado a las mejoras en la instrumentación analítica ha desvelado la enorme complejidad de la tradicionalmente denominada toxicidad diarreica “DSP” que en la

actualidad integra un elevado número de toxinas, congéneres y derivados que sufren complejas transformaciones e inter-conversiones en su transmisión desde el fitoplancton a los moluscos y posteriormente durante su permanencia en los mismos hasta su eliminación. Asimismo, sustancias bioactivas históricamente asociadas a este síndrome y tradicionalmente reguladas dentro del grupo “DSP” han revelado con el tiempo que su distinta naturaleza química y mecanismo de acción las hace merecedoras de una clasificación y regulación al margen del síndrome DSP. Así, el control y manejo de este complejo grupo de toxinas lipofílicas constituye un desafío desde los puntos de vista analítico, toxicológico, legislativo y sanitario.

2. TOXINAS Y ESPECIES FITOPLANCTÓNICAS ASOCIADAS AL FENÓMENO DSP.

Históricamente, tres grupos de sustancias han sido incluidas en el grupo DSP: el ácido okadaico (AO) y las dinofisistoxinas (DTX1, DTX2, DTX3, etc), las pectenotoxinas (PTXs) y las yesotoxinas (YTXs). Todas ellas son poliéteres de elevado peso molecular, gran lipofilia y que comparten propiedades de solubilidad de tal forma que pueden ser co-extraídas utilizando los protocolos genéricos de extracción del ácido okadaico. Aunque presentan analogías, y en concreto los dos primeros grupos son producidos por las mismas especies de dinoflagelados (*Dinophysis* spp), su actividad biológica es muy diferente. Esto ha dado lugar a que en los últimos años se hayan realizado considerables esfuerzos dirigidos a elucidar su mecanismo de acción y potencia tóxica con el objeto de clasificarlas y regularlas de forma separada sobre la base de su verdadera trascendencia desde el punto de vista de la salud pública y de su compatibilización con la explotación de los recursos. Si bien estos aspectos se discutirán más adelante en profundidad, a lo largo de esta tesis doctoral se utilizará la denominación de toxinas “DSP” para el grupo del AO y las pectenotoxinas siguiendo el criterio marcado actualmente por la legislación europea (Decisión 225/2002), a sabiendas de que tan sólo el AO y algunos de sus derivados han mostrado un claro efecto diarreico en humanos y de la posibilidad de que en un futuro próximo las pectenotoxinas sean reguladas como un grupo de toxinas independiente del AO y derivados.

2.1. Ácido okadaico y derivados

Las principales toxinas de este grupo, el AO, la DTX1 y la DTX2, son sustancias polietéreas constituidas por una cadena carbonada lineal con un grupo carboxílico libre y que difieren en difieren en la presencia de grupos metilo en los carbonos C31 y C35 (Fig. 1). El peso molecular del AO es 804, y se han detectado un amplio número de isómeros, análogos y

derivados, aunque la estructura precisa de algunos de ellos no ha sido todavía elucidada. Los dinoflagelados productores de estas toxinas son especies planctónicas del género *Dinophysis*, tales como *D. acuminata*, *D. fortii*, *D. sacculus*, *D. acuta* y *Dinophysis norvegica* así como algunas especies bentónicas del género *Prorocentrum* como *Prorocentrum lima*, *P. maculosum* y *P. hoffmanianum* (Yasumoto *et al.*, 1980b,1987; Lee *et al.*, 1989a). Dado que el carácter bentónico de estas últimas especies dificulta su ingestión por parte de los moluscos, su implicación en episodios de intoxicación diarreica no es tan clara como en el caso de *Dinophysis* spp y sólo ha sido puesta en evidencia de forma sólida en moluscos de aguas canadienses (Lawrence *et al.*, 1998; 2000). En Galicia, la unión de *P. lima* a diferentes macroalgas de las cuerdas donde se cultivan los mejillones ha sido encontrada por Bravo (1991) con concentraciones de hasta 2255 cel g⁻¹ peso húmedo de *Ulva* spp, constituyendo un peligro potencial de contaminación de los moluscos. Sin embargo, los episodios de DSP en las áreas de producción han estado siempre asociados a la presencia de especies de *Dinophysis* en el plancton (Reguera *et al.*, 1993). Una parte de los estudios realizados en esta tesis doctoral, y que forman parte del capítulo I, fueron dirigidos a elucidar la contribución de *P. lima* a los episodios de DSP en Galicia.

AO, DTX1 y DTX2 han sido señaladas como las toxinas más relevantes desde el punto de vista de las intoxicaciones diarreicas (Murata *et al.*, 1982; Yasumoto *et al.*, 1985a; Hu *et al.*, 1992a), estando el AO asociado a casi todas las especies de *Dinophysis* y la DTX2 vinculada fundamentalmente a la presencia de *D. acuta* (Vale & Sampayo 1996; 2002d; James *et al.*, 1998a; Draisci *et al.*, 1998a). La DTX1 está asociada a la presencia de *D. fortii* y *D. norvegica* (Dahl and Yndestad, 1985; Dahl *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1989a; Suzuki *et al.*, 1997), y a *D. acuta* en Suecia y Noruega (Tangen *et al.*, 1983; Krogh *et al.*, 1985). Se han detectado numerosos isómeros del AO y las DTXs (DTX2B, DTX1B, DTX2C, etc.) en fitoplancton y moluscos utilizando cromatografía líquida de alta eficacia asociada a espectrometría de masas (HPLC-MS), si bien parecen estar presentes en los moluscos en muy pequeñas cantidades (James *et al.*, 1997; Draisci *et al.*, 1998b). En Galicia hemos comprobado que el AO está asociado a *D. acuminata* y a *D. acuta*, mientras que la DTX2 está asociada a la presencia de la segunda especie como muestra la información obtenida en esta tesis doctoral (Blanco *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 2001)

En lo que respecta a los derivados del ácido okadaico y análogos (Fig. 1) se han documentado toda una serie de compuestos que difieren de las toxinas originales en: a) la esterificación del grupo hidroxilo de la posición C7 con diversos ácidos grasos de diferente

longitud (usualmente entre 14 y 17 carbonos) y nº de insaturaciones, y que da lugar a una mezcla compleja de derivados acilados agrupados comúnmente bajo el término “DTX3” b) formación de diol ésteres con dioles insaturados de entre 7 y 9 carbonos, esterificando el grupo carboxilo c) oxidación del fragmento diol de las moléculas de diol ésteres d) esterificación de los diol ésteres con cadenas sulfatadas que pueden incluir o no una función amida en la parte polar de la cadena para dar lugar a derivados hidrosolubles del tipo DTX4 ó DTX5 respectivamente y e) la carencia de grupo hidroxilo en la posición C2 o en la posición C7.

La “DTX3”, no ha sido detectada en fitoplancton y su aparición en los moluscos es producto de la acilación metabólica del AO, DTX1 o DTX2 en los tejidos de los moluscos (Suzuki *et al.*, 1999). Su presencia ha sido demostrada en moluscos de Japón, Irlanda y Portugal (Yasumoto *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 1993, Vale and Sampayo, 1999). Los trabajos que forman parte de esta tesis doctoral (Fernández *et al.*, 1996; 1998), y que se muestran en los artículos 7 y 8 del capítulo II, permitieron entre otros resultados, la primera detección de estos compuestos en moluscos de las Rías Gallegas y alertaron de la pérdida de los mismos que se producía durante la aplicación de ciertos protocolos de purificación de las muestras de moluscos destinada al análisis de toxinas DSP. La presencia de DTX3 en almejas (*Scrobicularia plana*) y navajas (*Solen marginatus*) de aguas portuguesas ha sido relacionada con una reciente intoxicación diarreica en Portugal (Vale and Sampayo, 2002c).

En lo que respecta a los diol ésteres y a los derivados hidrosolubles sulfatados, DTX4 y DTX5, inicialmente se asumió que estos compuestos tenían una presencia minoritaria y, además, restringida a los dinoflagelados bentónicos del género *Prorocentrum*, lo que los hacía relativamente poco relevantes desde el punto de vista de la salubridad de los moluscos. Recientemente se ha demostrado que diferentes especies del género *Dinophysis* pueden producirlos (Suzuki *et al.*, 2004; Mackenzie *et al.*, 2005).

La posibilidad de que estos compuestos puedan ser relevantes en *Dinophysis* de las Rías Gallegas se discute en dos contribuciones a esta tesis. En el artículo 5 del capítulo I, una de las contribuciones más recientes (Fernández *et al.*, 2006), se observó que las células de *D. acuta* sometidas a inhibición enzimática no presentaban concentraciones detectables de AO y DTX2, apareciendo la PTX2 como la toxina principal y sugiriendo la presencia del AO y la DTX2, ya evidenciada en trabajos anteriores, en forma de derivados conjugados (ésteres o compuestos sulfatados).

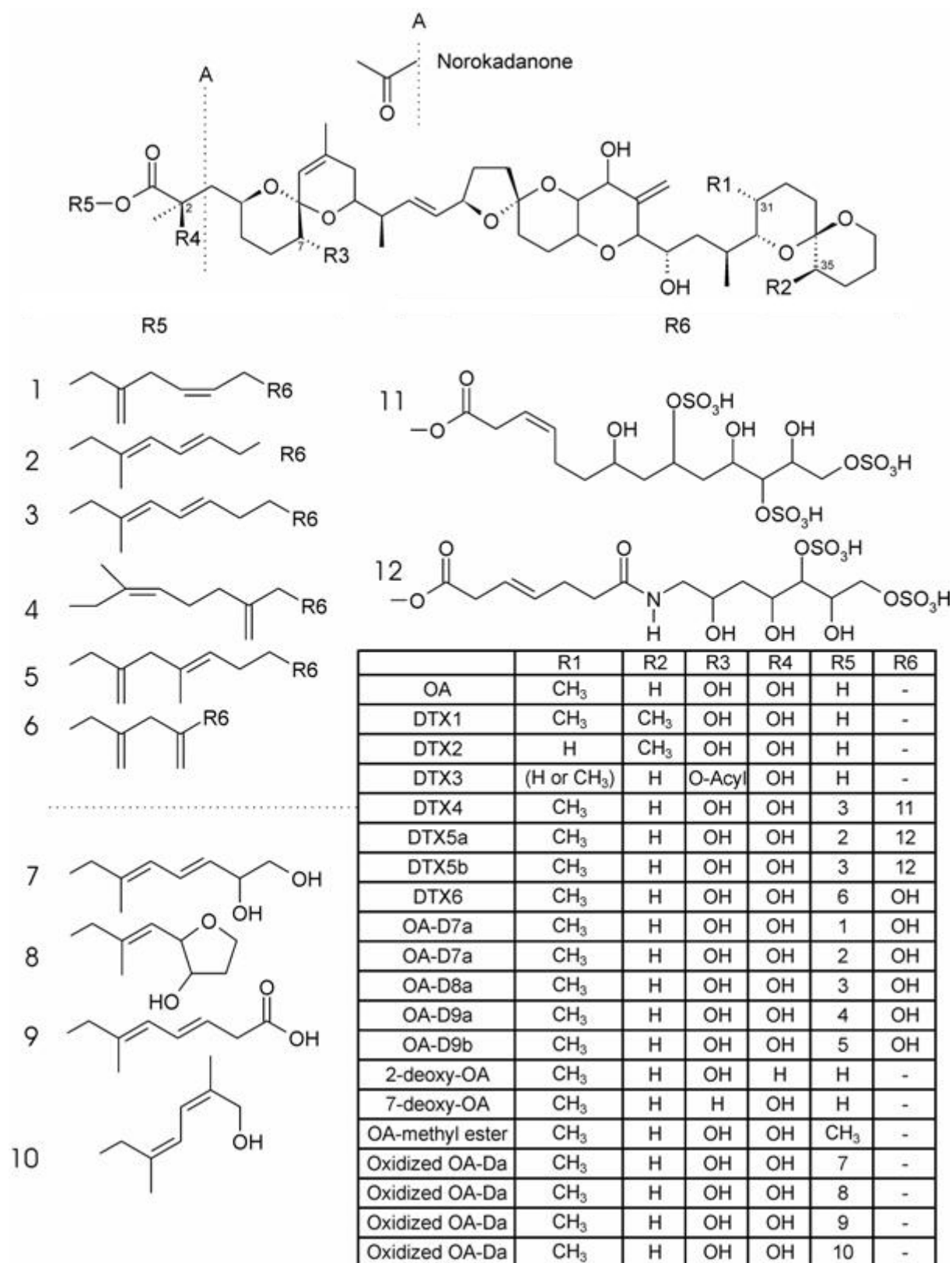


Figura 1.- Estructuras del AO, dinophysistoxinas y algunos de sus derivados. Los diol ésteres del ácido okadaico se designan como OA-D#x, donde # es el n° de átomos de carbono de la cadena diol y x es una asignación arbitraria. DTX6 es un diol éster que ha recibido esta designación específica. “Oxidized OA-Dx” son algunos derivados producidos por la oxidación de los diol ésteres. Norokadanona es un posible precursor del AO encontrado en *Prorocentrum lima*

En el artículo 8 del capítulo II (Moroño *et al.*, 2003), los resultados obtenidos sugieren que estos compuestos pueden llegar a ser el componente principal del perfil de toxinas de las poblaciones de *Dinophysis*.

2.2. Pectenotoxinas

Las Pectenotoxinas son un grupo de macrólidos polietéreos (Figura 2) de naturaleza neutra, de los cuales se han aislado hasta la fecha 14 análogos principales, una serie de epímeros conformacionales, los ácidos secoicos correspondientes a las toxinas principales y, muy recientemente, ésteres con ácidos grasos de diversa longitud (Wilkins *et al.*, 2006).

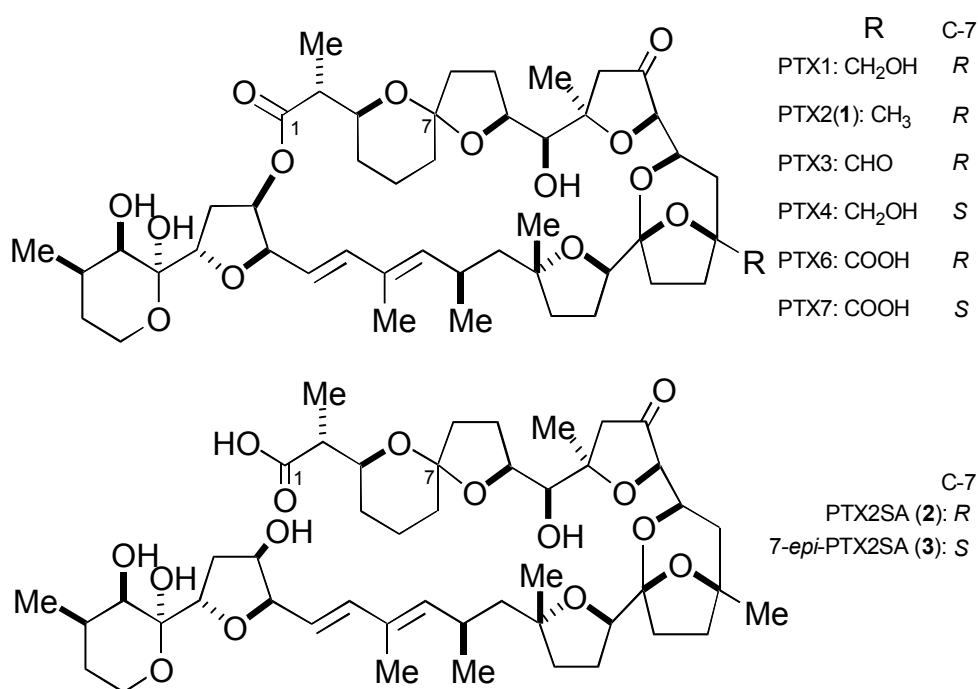


Figura 2: Estructura de las principales pectenotoxinas (PTXs) y ácidos secoicos de las pectenotoxinas (PTXSA)

La Pectenotoxina-2 (PTX2) ha sido detectada en diversos lugares y especies. Inicialmente fue registrada en *Dinophysis fortii* (Lee *et al.*, 1989a, 1989b; Draisci *et al.*, 1996; 1999; Suzuki *et al.*, 1998) en Japón e Italia, y recientemente en *D. acuminata* en Noruega, Nueva Zelanda y Chile (Miles *et al.*, 2004a, Mackenzie *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, *en prensa*) en *D. acuta* en Nueva Zelanda (Suzuki *et al.*, 2003) y Portugal (Vale and Sampayo, 2002a) y en Galicia

(Fernández *et al.*, 2003 a; Fernández *et al.* 2006) así como también en *D. caudata* (Fernández *et al.*, 2006), como se muestra en los Artículos 4 y 5 del capítulo I, que forman parte de la presente tesis doctoral.

Se han detectado otras pectenotoxinas también en células de *Dinophysis*, como es el caso de la PTX11, PTX13 y PTX14 en *D. acuta* y la PTX12 en *D. acuta*, *D. acuminata*, *D. rotundata* y *D. norvegica* (Miles *et al.*, 2004 b; Miles *et al.*, 2006). La mayor parte de las restantes PTXs, incluidos los ácidos secoicos (PTX2SA) son probablemente, en su inmensa mayoría, productos de transformaciones metabólicas oxidativas de las pectenotoxinas principales en los moluscos o en el plancton. Estos últimos compuestos se han encontrado en moluscos de diferentes localizaciones geográficas (Daiguji *et al.*, 1998; James *et al.*, 1999b) y también en moluscos de Galicia, como se muestra en el Artículo 4 del capítulo I de la presente tesis (Fernández *et al.*, 2003).

2.3. Yesotoxinas

La Yesotoxina (YTX) es una sustancia polietérea disulfatada, cuya estructura recuerda a las brevetoxinas. La presencia de YTX ha sido confirmada en moluscos de Japón (Murata *et al.*, 1987), Noruega (Lee *et al.*, 1989), Chile (Zhao *et al.*, 1993), Italia (Ciminiello *et al.*, 1997, 1999) y Nueva Zelanda (Yasumoto & Takizawa, 1997; MacKenzie *et al.*, 1998). En los últimos años, se ha confirmado la ocurrencia de un amplio número de análogos: 45-hidroxy YTX, 45, 46, 47 trinor YTX, homo YTX, adriatoxina, carboxi-YTX y 1-desulfo-YTX (Ciminiello *et al.*, 1998, 1999; Daiguji *et al.*, 1998; Satake *et al.*, 1997, 1999; Tubaro *et al.*, 1998) (Fig. 3). *Protoceratium reticulatum* ha sido identificado como la principal especie productora de YTX en Nueva Zelanda (MacKenzie *et al.*, 1998) y de YTX y 45, 46, 47 trinor YTX en Japón (Satake *et al.*, 1999). La Homo-YTX fue detectada en una muestra de red en la que la especie predominante era *Lingulodinium polyedrum*. Si bien cultivos de laboratorio de esta misma especie procedentes de Nueva Zelanda, Estados Unidos y Japón no produjeron yesotoxinas, la producción de YTX por cultivos de *L. polyedrum* procedentes de aguas de Andalucía fue confirmada por HPLC-MS (Paz *et al.*, 2004). En Galicia se han registrado eventos ligados a *P. reticulatum* y Yesotoxinas en las Rías Altas (Arévalo *et al.*; 2006). Tanto *Protoceratium reticulatum* como *Lingulodinium polyedrum*, son especies ubicuas, por lo que la contaminación de moluscos con YTXs se presenta como un fenómeno generalizado.

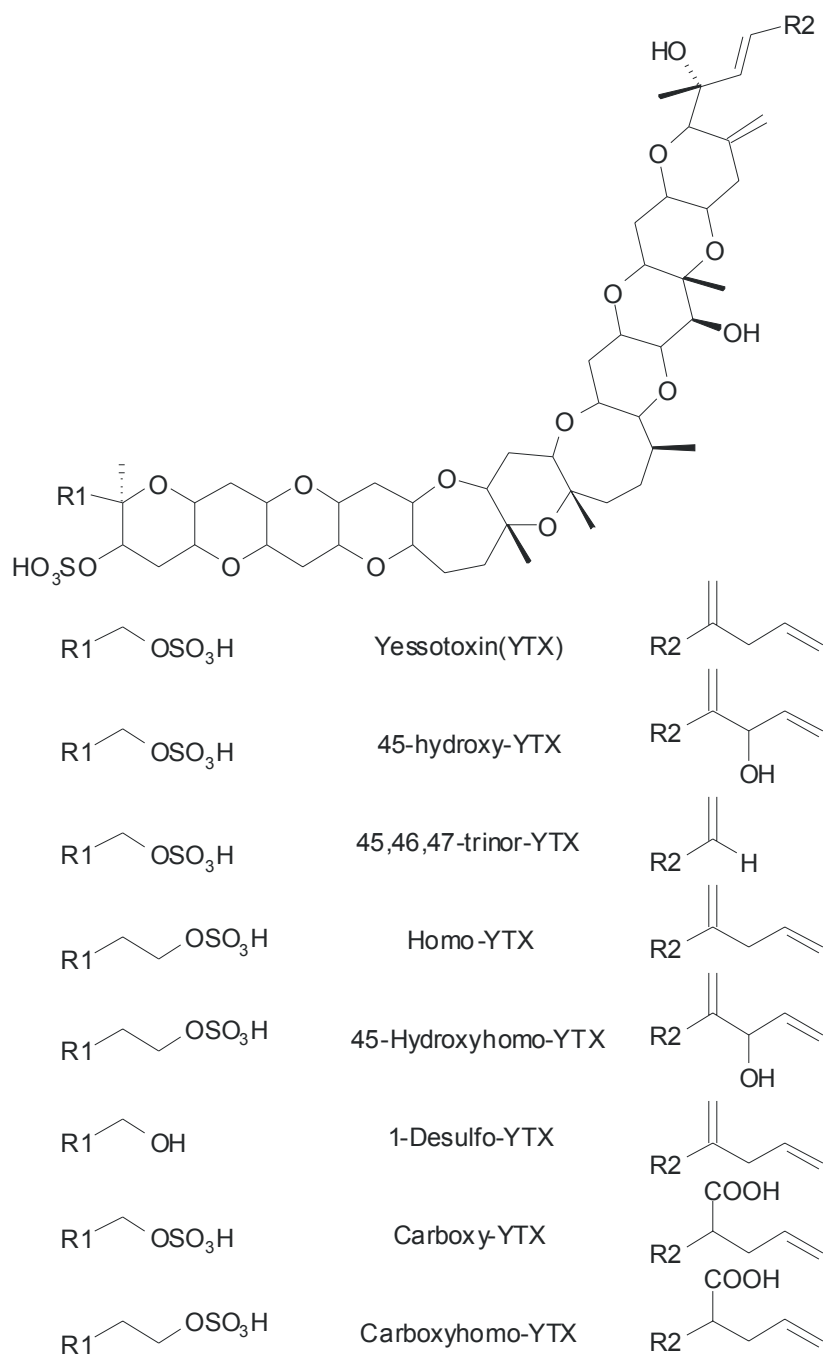


Figura 3.- Estructuras de las principales yesotoxinas y adriatoxina.

2.4. Dinoflagelados y toxinas responsables de los episodios de toxicidad DSP en las Rías Gallegas

Los primeros registros de intoxicaciones DSP debidos al consumo de moluscos de las Rías Gallegas datan de 1981, fecha en la que se registró un brote de gastroenteritis asociado al

consumo de mejillones que afectó a 5000 personas en España (Campos *et al.*, 1982). El conocimiento de la “Intoxicación diarreica por bivalvos” (DSP) y la identificación de *Dinophysis fortii* como el agente de estos episodios en Japón sugirió que el episodio tóxico de 1981, así como otros brotes asociados al consumo de mejillones depurados en 1978 y 1979, podían tratarse de episodios de DSP asociados a la presencia de *Dinophysis* spp (Campos *et al.*, 1982; Fraga *et al.*, 1984).

A partir de 1982, las autoridades sanitarias gallegas incorporaron el bioensayo en ratón para la detección de toxicidad DSP al programa de control sanitario ya existente para la detección de PSP desde el año 1977, y en el que el control de fitoplancton era desarrollado por el Instituto Español de Oceanografía. A partir de 1992, el seguimiento de las especies fitoplanctónicas nocivas y de la toxicidad de origen microalgal en moluscos fue asumido por el Centro Galego para el Control da Calidade do Medio Mariño (Consellería de Pesca, Xunta de Galicia), en la actualidad INTECMAR.

Los episodios de DSP en las Rías Gallegas están correlacionados principalmente con proliferaciones de *D. acuminata* en la Ría de Ares y de *D. acuminata* y *D. acuta* en las Rías Bajas. Si bien *D. acuminata* y *D. acuta* son componentes regulares del fitoplancton y constituyen las especies de *Dinophysis* más abundantes, otras especies como *D. rotundata*, *D. caudata*, *D. tripos* y *D. hastata*, están también presentes en ocasiones, aunque en número considerablemente más bajo. Los primeros estudios sobre el perfil de toxinas de los moluscos de las Rías Gallegas habían demostrado la presencia de AO en mejillones causantes de episodios DSP (Kumagai *et al.*, 1986; Rodríguez Vázquez *et al.*, 1989; Gago *et al.*, 1993) y los estudios del contenido celular de toxinas habían demostrado la presencia de AO en *D. acuta* de la Ría de Vigo (Lee *et al.*, 1989a).

Estudios posteriores, algunos de los cuales forman parte de esta tesis, revelaron un perfil de toxinas en los moluscos y en el fitoplancton considerablemente más complejo. Además del AO, se identificó la presencia de DTX2 en arrastres fitoplanctónicos (Blanco *et al.*, 1995), en mejillones (Gago-Martínez *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 1998) y en células de *D. acuta* aisladas por micromanipulación (Fernández *et al.*, 2001) y la existencia en los moluscos de derivados acilados de ambas toxinas (Fernández *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 1998). Más recientemente, se demostró la presencia de PTX2, en ocasiones como toxinas dominantes en arrastres fitoplanctónicos ricos en *D. acuta* y *D. caudata* (Fernández *et al.*, 2003a) y en células aisladas de estas dos mismas especies (Fernández *et al.*, 2006). Asimismo, se detectó la presencia en mejillones de ácidos secoicos de la PTX2 (Fernández *et al.*, 2003a).

En lo que se refiere a *P. lima*, su presencia en las costas de Galicia es conocida desde 1985, fecha en la que se realizaron cultivos de esta especie a partir de muestras de la laguna de las Islas Cíes y de muestras tomadas en las cuerdas de mejillón en las rías de Vigo y Pontevedra (Bravo *et al.*, 1997). Los análisis de toxinas a partir de cinco clones de *P. lima* aislados de la costa gallega realizados por Lee *et al.* (1989a) mostraron la presencia de AO y DTX1 y diferencias en las cantidades de AO y DTX1 entre las distintas cepas. En un estudio posterior, dos diol ésteres del AO fueron aislados e identificados mediante métodos espectroscópicos en cepas de la Ría de Vigo (Norte *et al.*, 1994). Los estudios realizados en esta tesis doctoral y que se presentan en el capítulo I fueron dirigidos a estudiar el perfil de toxinas de 19 cepas de *P. lima* aisladas en la Ría de Vigo y en la Ría de Pontevedra, y a elucidar la contribución de este dinoflagelado bentónico a los episodios de DSP en Galicia.

3. EPIDEMIOLOGIA Y TOXICOLOGIA DE LAS TOXINAS DSP

Los distintos grupos de toxinas incluidas históricamente en la amplia denominación de toxinas “DSP” presentan diferentes efectos en los humanos. Existen datos epidemiológicos de intoxicaciones producidas por el ácido okadaico y derivados que muestran que la intoxicación comienza entre tres y doce horas después de la ingestión de los moluscos y cursa con trastornos gastrointestinales tales como diarrea, náuseas y vómitos (Yasumoto *et al.*, 1978, 1980; Kat *et al.*, 1979, 1983), produciéndose una recuperación completa, en la mayor parte de los individuos afectados, en el plazo de tres días, y no habiéndose registrado hasta la fecha casos de mortalidad. La toxicidad depende de la toxina específica y parece estar asociada a la presencia de la función carboxílica en forma libre. El nivel de AO necesario para inducir diarrea en adultos está entre 40 y 50 µg. En una intoxicación ocurrida en Noruega, alrededor de 70 personas fueron hospitalizadas con los síntomas usuales de DSP tras el consumo de mejillones. Los niveles encontrados en mejillones no consumidos fueron del orden de 55-56 µg eq. AO/100 g vianda de mejillón (Aune, 2001). Los derivados en los que el grupo carboxilo está esterificado muestran una toxicidad considerablemente menor (Hu *et al.*, 1992b, 1995). La esterificación del hidroxilo en la posición C7, sin embargo, no parece que reduzca sustancialmente la toxicidad y se han documentado intoxicaciones producidas por bivalvos que contenían principalmente este tipo de ésteres del ácido okadaico (Vale and Sampayo, 2002c).

Estudios experimentales realizados en ratones muestran que la dosis letal del AO por administración intraperitoneal (LD50) es de 200 µg kg⁻¹. Los valores correspondientes para

DTX1 y “DTX3” son 160 y 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente (Yasumoto *et al.*, 1989), aunque observaciones recientes (Ito *et al.*, 2006) indican que la DTX3 presenta una toxicidad similar a la del AO si se asegura su solubilidad en el líquido inyectado a los ratones. Cuando el AO se administra oralmente a ratas, se observan daño intestinal, diarrea y muerte, pero no se observan efectos en el hígado. Sin embargo, la administración intraperitoneal no produce apenas efecto en la función intestinal pero afecta al hígado de manera considerable (Berven *et al.*, 2001).

Aparte de los efectos agudos, diferentes trabajos han puesto de manifiesto que este grupo de toxinas podrían producir importantes efectos crónicos. Así, se ha demostrado que estos compuestos son promotores de crecimiento tumoral (Fujiki *et al.*, 1988) y se ha sugerido recientemente que podrían actuar como inductores tumorales (Ten-Hage *et al.*, 2000; Creppy *et al.*, 2002). Aunque las observaciones disponibles sobre poblaciones humanas expuestas no son concluyentes, existen ciertas evidencias de asociación con cáncer localizado en diferentes partes del aparato digestivo (cáncer de esófago, estómago, colon e hígado en varones y de estómago y páncreas en mujeres) (Cordier *et al.*, 2000). En la tortuga, *Chelonia midas*, la aparición de una neoplasia, fibropapilomatosis, ha sido relacionada con la abundancia de *Prorocentrum lima*, productor de toxinas DSP del grupo del ácido okadaico (Landsberg *et al.*, 1999).

Con respecto al mecanismo de acción, el AO y análogos son potentes inhibidores de las protein-fosfatasa (serina y treonina), enzimas que son responsables de la defosforilación de ciertas proteínas y que desempeñan un papel crítico en el control de procesos biológicos tales como la división y el crecimiento celular, la organización estructural, el metabolismo, el control hormonal, etc (Bialojan and Takai, 1988; Cohen, 1989). Este mecanismo es probablemente el principal responsable de la inducción de diarrea, que estaría asociada a la hiperfosforilación de los canales iónicos de las células epiteliales del intestino que alterarían el equilibrio hídrico (Cohen *et al.*, 1990) y de la promoción tumoral observada en estudios *in vitro* (Suganuma *et al.*, 1988).

En lo que concierne a las Pectenotoxinas y Yesotoxinas no existen datos epidemiológicos que asocien inequívocamente la presencia de estas sustancias en los moluscos con intoxicaciones diarreicas. En Australia se registraron dos episodios de intoxicación en humanos coincidentes con la presencia de PTXs en las tellinas ó “pipis” (*Donax deltoides*). En diciembre de 1997, 100 personas resultaron intoxicadas tras el consumo de este molusco,

de las cuales al menos 56 casos requirieron hospitalización. Los principales síntomas de la intoxicación fueron náuseas, vómitos y diarrea. En marzo de 2000, se registró otra intoxicación con la misma especie. La principal pectenotoxina detectada en ambos casos fue el ácido secoico de la PTX2. La dosis ingerida por el individuo que resultó más afectado fue de aproximadamente 150 μg de PTX2SA, lo que representa una dosis de 2 μg de toxinas por kg de peso corporal (Burguess and Shaw, 2001). Sin embargo, al menos en el primero de los episodios, se detectó también la presencia de ésteres del ácido okadaico en los moluscos consumidos (Quilliam *et al.*, 2000), lo que pone en cuestión el origen real de la intoxicación en humanos y por tanto la toxicidad real de las Pectenotoxinas.

Estudios con animales de experimentación muestran que la toxicidad aguda intraperitoneal de las PTXs oscila entre 230 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en el caso de la PTX2 y 770 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en el caso de la PTX4. Las pectenotoxinas no causan diarrea por administración intraperitoneal y no se observa toxicidad oral a dosis de 5000 μg de PTX2 y PTX2SA (Miles *et al.*, 2004). Las PTXs no inhiben las protein-fosfatasas, pero exhiben una potente citotoxicidad de manera que dosis comprendidas entre 500 y 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ inducen necrosis en el hígado a las pocas horas de la inoculación intraperitoneal (Terao *et al.*, 1986, 1993). La inducción de apoptosis ha sido documentada por Fladmark *et al.* (1998). Se ha demostrado también que concentraciones micromolares de PTX6 inducen la despolarización de la F-actina en células de neuroblastoma (Leira *et al.* 2002). Estos mismos autores han sugerido que la disrupción del citoesqueleto puede ser un mecanismo clave en la toxicidad de esta toxina, y muy probablemente del resto de las pectenotoxinas.

Con respecto a las Yesotoxinas, no se han registrado hasta la fecha casos de intoxicación en humanos. La toxicidad intraperitoneal de estas toxinas es muy alta. Las dosis letales en ratón para los diferentes análogos por administración intraperitoneal oscilan entre 100 y 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ siendo en este caso el corazón el órgano diana (Murata *et al.*, 1987). Si bien el derivado desulfatado (desulfo-YTX) no presenta cardiotoxicidad, hígado y páncreas se ven afectados a partir de dosis intraperitoneales de 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Terao *et al.*, 1990). La toxicidad oral es inferior a la toxicidad intraperitoneal en más de un orden de magnitud (Ogino *et al.*, 1997; Aune *et al.*, 2001, 2002; Tubaro *et al.*, 2004 a, 2004b), probablemente debido a la presencia de los grupos sulfato en la molécula que hace que estos compuestos no sean absorbidos o metabolizados en el tracto digestivo cuando se administran oralmente. No se observan efectos diarreicos tras su administración y la LD 50 es muy alta (Tabla 1).

Tabla 1.- Toxicidad de las principales toxinas AOs, PTX y YTX por inyección intraperitoneal en ratón

Grupo	Compuesto	LD ₅₀ (µg kg ⁻¹)	Referencia	Patología
Acido okadaico	AO	200	Yasumoto <i>et al.</i> , 1989	Diarrea; promoción e inducción tumoral
	DTX1	160	Yasumoto <i>et al.</i> , 1989	Diarrea
	DTX3	500	Yasumoto <i>et al.</i> , 1989	Diarrea
Pectenotoxinas	PTX1	250	Yasumoto <i>et al.</i> , 1989	Hepatotoxicidad
	PTX2	230	Yasumoto <i>et al.</i> , 1989	Hepatotoxicidad, diarrea
	PTX3	350	Yasumoto <i>et al.</i> , 1989	*
	PTX4	770	Yasumoto <i>et al.</i> , 1989	*
	PTX6	500	Yasumoto, 2000	*
	PTX7	>5000	Sasaki <i>et al.</i> , 1998	*
	PTX8	>5000	Sasaki <i>et al.</i> , 1998	*
	PTX9	>5000	Sasaki <i>et al.</i> , 1998	*
Yesotoxinas	YTX	100	Yasumoto <i>et al.</i> , 1989	Cardiotoxicidad
	HydroxyYTX	500	Satake <i>et al.</i> , 1996	*
	TrinorYTX	220	Satake <i>et al.</i> , 1996	*
	HomoYTX	100	Satake <i>et al.</i> , 1997	*
	45-hydroxyhomo YTX	500	Satake <i>et al.</i> , 1997	*
	Desulfo YTX	500	Daiguji <i>et al.</i> , 1998	*
	CarboxyYTX	500	Ciminiello <i>et al.</i> , 2000	*

* En el caso de PTX y YTX, los estudios de toxicidad oral y de citotoxicidad solo han sido llevados a cabo para la PTX1, PTX2 y YTX. Es muy posible que los correspondientes análogos den lugar a patologías idénticas o similares,

De acuerdo con estudios recientes de toxicidad oral en ratones (Aune *et al.*, 2002; Espenes *et al.*, 2004) no parece que estas toxinas representen un grave riesgo para la salud humana. A nivel celular, las YTXs inducen apoptosis en neuroblastoma humano, pero este efecto es cuantitativamente más bajo que el observado en el ácido okadaico (Alfonso *et al.*, 2003). El mecanismo de acción de las YTXs no es conocido pero si está claro que no inhiben las protein-fosfatasa como es el caso del ácido okadaico y análogos y su acción difiere también

de la de los otros dos grupos de toxinas estructuralmente similares como son las ciguatoxinas y las brevetoxina. Estudios con linfocitos humanos sugieren que estas toxinas actúan sobre el AMP cíclico, incrementando los niveles citosólicos de calcio (Rosa *et al.*, 2001). Estudios recientes señalan que un aumento en la actividad de las fosfodiesterasas (PDE) es el principal mecanismo de acción, si bien tanto el tipo de fosfodiesterasas implicadas como la ruta precisa de interacción requieren estudios adicionales (Alfonso *et al.*, 2003). En el caso de que la diana de estas toxinas fuera la PDE III, muy abundante en el músculo cardíaco, esto explicaría fácilmente la cardiotoxicidad.

La mayor parte de los datos toxicológicos disponibles en relación a las PTXs y YTXs proceden de estudios realizados mediante administración intraperitoneal de las toxinas a los animales de experimentación, de manera que la extrapolación de estos resultados para determinar los efectos en el hombre y por tanto el establecimiento de los límites de tolerancia es difícil, siendo necesario completar los mismos con estudios robustos de toxicidad oral que han estado dificultados hasta la fecha por la escasez o carencia de toxinas puras. La carencia de datos epidemiológicos añade dificultades a la realización de estudios formales de análisis de riesgo que permitan el establecimiento de límites de tolerancia, y por tanto faciliten el establecimiento de regulaciones que, salvaguardando la salud pública, no produzcan pérdidas económicas innecesarias a los sectores de producción.

A pesar de las evidentes limitaciones de los datos disponibles, en los últimos años se han establecido en las legislaciones niveles para los diferentes grupos de toxinas lipofílicas que serán discutidos en el apartado relativo a las regulaciones.

4. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LAS TOXINAS DSP.

4.1. Generalidades

Con el fin de prevenir que puedan llegar al consumidor moluscos tóxicos, se han desarrollado diferentes métodos para la detección de toxinas marinas, que en muchos casos, en un tiempo reducido, permiten detectar su presencia en los moluscos a niveles muy por debajo de lo que se considera un riesgo; de ahí que en la última década se hayan reducido notablemente el número de intoxicaciones. Dichos métodos han de abordar dificultades tales como la presencia de las toxinas en matrices biológicas complejas y la presencia de mezclas de congéneres relacionados estructuralmente y con potencias tóxicas que pueden llegar a diferir hasta en tres órdenes de magnitud, como en el caso de las toxinas paralizantes PSP

(Oshima *et al.*, 1993). Hay que añadir las dificultades ocasionadas por la ausencia en la mayoría de estas sustancias de grupos cromóforos que faciliten su detección por las técnicas convencionales de espectrofotometría UV-Visible o de fluorescencia.

La aparición de toxinas de diferentes grupos en un mismo producto marino no es un hecho infrecuente y representa una complicación adicional a efectos de determinar la toxicidad de los mariscos. Es digna de mención la ocurrencia simultánea en las aguas costeras de especies fitoplanctónicas productoras de toxinas diarreicas y aquellas productoras de toxinas paralizantes, y como consecuencia de este hecho, la co-ocurrencia de DSP y PSP en los moluscos (Gago-Martínez *et al.*, 1996; Amzil *et al.*, 1999). Las toxinas paralizantes, incluso cuando se encuentran en niveles por debajo del límite de detección del bioensayo en ratón utilizado habitualmente para su determinación (AOAC, 1995), dan lugar a interferencias en uno de los métodos más extendidos de detección de toxinas DSP, el bioensayo en ratón con extracción acetónica (Yasumoto *et al.*, 1978), que de no ser eliminadas no permitirían la determinación de la presencia de toxinas diarreicas.

Hay que mencionar la posibilidad que se discutirá en capítulos posteriores de esta tesis doctoral de biotransformaciones de las toxinas a lo largo de su transmisión a través de la cadena trófica, mediante diferentes procesos metabólicos, de tal forma que la composición tóxica de los transvectores, puede diferir notablemente de aquella de las microalgas productoras de las toxinas. Una última dificultad viene dada por la labilidad química de algunas de estas sustancias que hace que puedan sufrir transformaciones durante los procesos de extracción, purificación y análisis.

De manera general, y atendiendo a la naturaleza de la información obtenida a partir de los métodos de determinación, éstos pueden clasificarse en métodos de ensayo y métodos analíticos (Sullivan *et al.*, 1993).

En el área de la determinación de toxinas, el término ensayo, se refiere a aquellos métodos que proporcionan un valor del contenido total de toxinas o de actividad tóxica basado en la medición de una única respuesta, biológica o bioquímica, que engloba a todos los congéneres presentes en la muestra. La determinación de la toxicidad se lleva a cabo en función de una curva dosis-respuesta que se realiza usualmente con una de las toxinas representativas del grupo objeto de estudio, expresándose finalmente la toxicidad total en equivalentes de dicha toxina. Dentro de este primer grupo se encuadrarían los bioensayos *in*

vivo, los ensayos de inhibición enzimática, los ensayos celulares, los ensayos de receptor, los inmunoensayos y los ensayos electrofisiológicos.

El término análisis se refiere a aquellos métodos de detección en los que se realiza una separación, identificación y posterior cuantificación individual de las toxinas en función de una respuesta instrumental que es proporcional a la concentración de cada una de las toxinas presentes en la muestra. Dicha cuantificación requiere la calibración previa del equipo instrumental con patrones de concentración conocida de cada una de las toxinas objeto de determinación. La respuesta instrumental debe ser convertida posteriormente a valores de toxicidad en función de factores de conversión específicos para cada toxina, de manera que la toxicidad global se determina como un sumatorio de las toxicidades individuales. En este segundo grupo se incluyen los métodos químicos basados en la separación de las toxinas por cromatografía líquida de alta eficacia y detección colorimétrica, fluorimétrica o por espectrometría de masas, así como la electroforesis capilar.

Dejando a un lado valoraciones de carácter económico, la elección de unos u otros métodos se realiza en función de los objetivos del estudio a realizar. Los métodos químicos instrumentales se utilizan generalmente en programas de investigación que requieran la identificación y cuantificación de cada una de las toxinas presentes. En los programas de monitorización o control sanitario, en aras de proteger la salud pública, se da relevancia al conocimiento de la toxicidad global potencial por lo que se han utilizado preferentemente ensayos.

4.2. Ensayos *in vivo*

Hasta la fecha, la mayor parte de los programas de control de toxinas en los alimentos han estado basados en ensayos *in vivo*, esto es, ensayos con animales, que si bien han demostrado su eficacia en la protección de la salud pública, al poner en evidencia la toxicidad de alimentos no aptos para el consumo, están lejos de la consideración de “ideales”. El principio general de los ensayos *in vivo* para determinación de ficotoxinas se basa en la administración al animal de la muestra a analizar o de un extracto de la misma, ya sea por vía oral o, lo que es más usual, mediante inyección intraperitoneal, seguida de la observación de los síntomas y/o de la determinación del tiempo de supervivencia, parámetro que se utiliza frecuentemente para la cuantificación a través de curvas dosis-respuesta previamente establecidas. Los bioensayos en ratón son poco selectivos, de baja especificidad y

sensibilidad, pueden producir falsos positivos debido a interferencias de las matrices biológicas y la variabilidad entre laboratorios es alta (alrededor de un 20%). Sin embargo, la baja especificidad es de gran utilidad desde el punto de vista de la estimación del riesgo para la salud pública, puesto que permite la detección de nuevas toxinas o congéneres, proporcionando de esta forma un alto grado de protección al consumidor.

A diferencia de la situación del control sanitario de las toxinas PSP, en el caso de las toxinas históricamente incluidas en el grupo DSP no ha existido un protocolo de bioensayo en ratón acordado y reconocido internacionalmente y que haya sido sometido a un proceso formal de estandarización y validación. Si bien es cierto que la mayor parte de los países que realizan el control de estas toxinas en los moluscos han venido utilizando ensayos *in vivo*, existen diferencias en cuanto al animal usado (rata o ratón albino), en cuanto al modo de administración de la toxinas (ingestión oral en el caso de la rata, o inyección intraperitoneal en el caso del ratón) y en cuanto a la naturaleza y proporción de los solventes utilizados para la extracción de las toxinas. Esto se ha traducido en una diferente especificidad, selectividad y recuperabilidad de los bioensayos y por tanto en una falta de equivalencia de los mismos, de tal manera que algunos protocolos pueden detectar todo el rango de sustancias lipofílicas bioactivas potencialmente presentes en los mariscos contaminados, mientras que la mayor especificidad de otros protocolos limita el espectro de toxinas detectables por los mismos. Existen igualmente discrepancias en cuanto a los criterios de positividad del ensayo.

Esta situación no es gratuita sino que se ha producido como consecuencia de la escasez de estudios epidemiológicos y toxicológicos que permitieran establecer los riesgos derivados de la exposición aguda y crónica a las sustancias bioactivas actualmente incluidas en el grupo DSP, y por tanto los niveles de tolerancia. A esto hay que añadir la controversia histórica que ha existido en relación a la idoneidad de la clasificación de algunas de estas sustancias polietéreas liposolubles dentro del grupo DSP.

En el trabajo que constituye el capítulo III de esta tesis doctoral y que fue publicado con el título “*In vivo* assays for phycotoxins” como capítulo del libro “Manual on Harmful Marine Microalgae” (Fernández *et al.*, 2003b) se describen y valoran los diferentes bioensayos con mamíferos utilizados para la detección de toxinas marinas.

4.3. Ensayos *in vitro*

Con el fin de reducir en el futuro el uso de animales en los programas de control alimentario y en aras de lograr una mayor sensibilidad y especificidad, se han desarrollado en los últimos años diferentes ensayos *in vitro*, que pueden ser clasificados en dos grupos: ensayos funcionales y ensayos estructurales. En los ensayos funcionales la respuesta que se mide está directamente relacionada con el mecanismo de acción responsable de la toxicidad de la sustancia que se determina, ya sea la inhibición de la actividad enzimática ó la activación o el bloqueo de canales iónicos. El grado de correlación entre la respuesta observada y la toxicidad real es esperable que sea muy alto con independencia de los perfiles tóxicos, es decir, de los tipos y cantidades de toxinas presentes en la muestra analizada. En el caso de los ensayos estructurales (ej. inmunoensayos) la respuesta está basada en el reconocimiento por parte de los anticuerpos de fragmentos de las estructuras moleculares de las toxinas que no están necesariamente ligados al mecanismo de acción de las mismas y por tanto a su actividad biológica. En este caso no siempre existe una buena correlación entre la respuesta inmunológica y la toxicidad real, de manera que los anticuerpos no identificarán a todos los congéneres activos (falsos negativos) y podrían reconocer congéneres inactivos (falsos positivos).

En general, la sensibilidad de los ensayos *in vitro* es varios órdenes de magnitud superior a la de los ensayos *in vivo*, aspecto relevante no sólo desde el punto de vista sanitario sino también desde el punto de vista de posibilitar una detección precoz de los episodios tóxicos que permita mitigar el impacto negativo de los mismos. Gran parte de los ensayos *in vitro* han sido desarrollados para su aplicación en placas de pocillos múltiples (ej. 96 pocillos), utilizando lectores con detección colorimétrica o fluorimétrica, o mediante contadores de centelleo, lo que permite la realización simultánea en un tiempo reducido de curvas de calibrado y el análisis de un alto número de muestras a través de diferentes diluciones. En contrapartida, los ensayos *in vivo* presentan la ventaja difícilmente superable de su potencial para la detección no solo de las toxinas ya conocidas, para las que han sido estandarizados, sino de otros compuestos bioactivos no conocidos de antemano que puedan representar un riesgo para la salud pública, y que no podrían ser detectados en el caso de utilizar métodos más específicos.

La aplicación de ensayos *in vitro* en laboratorios de control sanitario con fines de control oficial está todavía dificultada por el hecho de que no se ha realizado una validación

formal de los mismos a través de protocolos internacionalmente reconocidos (AOAC, ISO, etc.). Dichos protocolos establecen básicamente la realización de estudios intercomparativos y colaborativos entre un número suficiente de laboratorios de tal forma que se establezcan las características del método en términos de exactitud y precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y que se verifique la aplicabilidad del ensayo para la determinación de diferentes toxinas de un mismo grupo en las diferentes matrices biológicas que puedan ser objeto de análisis. Tanto en los procesos de desarrollo de los ensayos como en lo que se refiere a la validación e implantación de los mismos, es necesario disponer de las toxinas puras y de materiales tóxicos de concentración certificada que permitan la puesta a punto del ensayo y la realización de controles de calidad de los análisis. Si bien la disponibilidad y distribución de ciertas toxinas ha mejorado en los últimos años, existen todavía graves carencias en esta área que están retrasando el desarrollo, validación e implantación de estas nuevas metodologías. En lo que respecta a la detección de toxinas DSP se han desarrollado los siguientes ensayos *in vitro*:

Ensayos de inhibición enzimática

Como ya se mencionó en apartados anteriores, el AO y algunos de sus análogos (DTX1, DTX2) ejercen su actividad biológica a través de mecanismos de inhibición de las protein-fosfatasa PP1 y PP2A, dos importantes enzimas que intervienen en el control de procesos tales como la división y crecimiento celular, organización estructural, metabolismo, control hormonal, etc. Teniendo en cuenta que la magnitud de la inhibición de fosfatasa es proporcional a la concentración de toxinas, éste mecanismo puede ser utilizado para medir el contenido de estas sustancias en muestras de moluscos o fitoplancton.

Basándose en estos hallazgos se han desarrollado diferentes ensayos cuyo principal interés es que el parámetro que se evalúa, esto es la inhibición de las fosfatasa, está directamente relacionado con el mecanismo de acción de estas toxinas y por tanto con su acción biológica y toxicidad. Son por tanto ensayos funcionales. La magnitud de la inhibición enzimática puede ser medida utilizando diversos sustratos naturales o artificiales de las enzimas. Las fosfatasa actúan sobre los diferentes sustratos causando su desforilación, proceso que es fuertemente inhibido en presencia de estas toxinas. Así, se han desarrollado ensayos basados en sustratos radiactivos (Holmes *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1993; Honkanen *et al.*, 1996), ensayos colorimétricos (Takai and Mieskes 1991; Simon and Vernoux, 1994; Tubaro *et al.*, 1996) y ensayos fluorimétricos (Vieytes *et al.*, 1997). El ensayo fluorimétrico

utiliza PP2A comercial y diferentes sustratos fluorescente como son: 4-metil-lumbeliferona, fluorescein difosfato (FDP), 6,8, difluoro-7-hidroxi-4-metilumbeliferona fosfato (Di FMUP), 9H- (1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-one-7-yl) fosfato, sal diamonio (DDAO fosfato) y 4 metilumbeliferona fosfato (4-MUP). El ensayo puede realizarse con cualquiera de los sustratos mencionados en placas de pocillos múltiples, siendo necesario en este caso un lector de fluorescencia. Conlleva una extracción sencilla de las toxinas con metanol 80%, no requiere una purificación posterior de las muestras, y permite la realización del análisis simultáneo de un número elevado de muestras en un tiempo reducido. Es muy sencillo, de ejecución rápida y gran sensibilidad, con un límite de detección de 3.2 pg AO ml⁻¹. Los mismos autores han aplicado con éxito este tipo de ensayo a la determinación de microcistinas (Fontal *et al.*, 1999). Recientes estudios comparando el ensayo colorimétrico y el fluorimétrico (Mounfort *et al.* 1999) han mostrado que el ensayo fluorimétrico es más preciso y sensible y produce menos falsos positivos que el que utiliza los sustratos cromogénicos.

La metodología de los ensayos de inhibición enzimática hacen que estos sean muy simples, sensibles, rápidos y selectivos, y tienen capacidad para detectar otras sustancias bioactivas potencialmente tóxicas a través de los mismos mecanismos de inhibición enzimática. El ensayo es adecuado para la detección del AO, DTX1, DTX2 y cualquier derivado activo de estas toxinas. Así en los casos de la DTX3, los dioles-ésteres y la DTX4 que no presentan actividad inhibitoria su presencia mediante estos ensayos solo puede ser detectada si se someten a una hidrólisis previa. (Mounfort *et al.*, 2001).

A pesar de todo lo anterior, la utilización de estos ensayos con fines de control de la presencia de ácido okadaico y análogos en los moluscos, esta todavía limitada por la falta de estudios robustos de validación ya que los intentos realizados no han dado buenos resultados debido a problemas relacionados con la falta de estabilidad de los enzimas. Recientemente, Sekiguchi *et al.* (2006) han propuesto un ensayo similar con fosfatasas obtenidas a partir del gasterópodo marino *Neptuna arthritica* que presenta una estabilidad de un año. Ésta y otras iniciativas importantes dirigidas a la validación, hacen previsible que en un futuro próximo los ensayos de inhibición enzimática sean utilizados como herramientas de control sanitario. Como las pectenotoxinas no son inhibidores de las protein-fosfatasas, los ensayos de inhibición enzimática con fines de control sanitario tendrán que ser complementados con otros ensayos o análisis que detecten estos compuestos.

Inmunoensayos

Existen numerosas variantes de inmunoensayos que utilizan diferentes estrategias de acoplamiento antígeno-anticuerpo como reacciones directas o indirectas, reacciones de competencia, etc. La magnitud de la reacción inmunológica puede ser detectada de diversas maneras, ya sea mediante el uso de marcadores radiactivos (radioinmunoensayos, RIA), marcadores fluorescentes (FIA) o mediante acoplamiento de una reacción enzimática (EIA). Los inmunoensayos más frecuentes para la determinación de ficotoxinas son los denominados ELISAs (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) que pueden ser configurados en una gran variedad de formatos y en los que básicamente, se mide la interacción toxina-anticuerpo mediante la reacción de una enzima ligada al anticuerpo con un sustrato específico de la misma, reacción que da lugar a un producto coloreado o fluorescente.

Los inmunoensayos tienen un grado variable de reactividad con las diferentes toxinas pertenecientes a un mismo grupo y la sustitución de determinados grupos funcionales afecta a la reactividad cruzada de las toxinas con los anticuerpos. Los inmunoensayos son ensayos estructurales de tal forma que los anticuerpos reconocen moléculas de similar estructura, que podrían no ser tóxicas, produciéndose en este caso falsos positivos, y no reaccionan con moléculas diferentes que presenten actividad biológica similar produciéndose en este caso falsos negativos. La correlación entre la respuesta inmunológica y la toxicidad real depende por tanto de los perfiles tóxicos de las muestras de fitoplancton o de mariscos.

En relación a la detección de toxinas DSP, se han desarrollado varios métodos configurados como RIA o ELISA que utilizan anticuerpos preparados contra el AO. El radioinmunoensayo desarrollado por Levine y colaboradores (Levine *et al.*, 1988) se basa en la inhibición competitiva de la reacción entre AO tritado y el anticuerpo del AO producido por el ácido okadaico de las muestras. La magnitud de la inhibición se determina mediante contador de centelleo y permite la detección de hasta 0.2 ng AO ml⁻¹. El método es sin embargo muy laborioso y complejo para su uso rutinario.

Se han desarrollado dos ELISAs en forma de kits para la determinación de AO, el “DSP-Check” (Sceti, Tokio, Japón) y el “Okadaic acid kit” de Rougier Bio-Tech (Montreal), si bien solo el primero está disponible comercialmente. El “DSP-check” utiliza anticuerpos monoclonales previamente desarrollados por Usagawa y colaboradores (Usagawa *et al.*, 1989). Los anticuerpos monoclonales marcados con una enzima, reaccionan

competitivamente con una cantidad constante de ácido okadaico fijada en los pocillos y con el ácido okadaico procedente de la muestra objeto de análisis. La cantidad de enzima es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo fijado, que será tanto mayor cuanto menor sea la cantidad de AO en las muestras, y que es medida colorimétricamente, de manera que el contenido de AO de las muestras es inversamente proporcional a la absorbancia. La sensibilidad del ensayo es de 20 ng g⁻¹. Los anticuerpos utilizados en el kit presentan una reactividad cruzada de aproximadamente 40 % con la DTX2 (Carmody *et al.*, 1995 b) y del 70 % con la DTX1 (Usagawa *et al.*, 1989) y no reaccionan con la DTX3.

El kit de Rougier Bio-Tech, está basado en el uso de un anticuerpo monoclonal específico del AO (denominado 6/50) y un anticuerpo específico del anticuerpo monoclonal (1/59) (Shestowsky *et al.*, 1992) que está unido a la fase sólida y que compite con el ácido okadaico de las muestras por el anticuerpo 6/50. La cantidad de anticuerpo fijado es inversamente proporcional a la cantidad de AO y se mide mediante una reacción enzimática. La afinidad que presenta el anticuerpo 6/50 por la DTX1 y la DTX2 es entre 10 y 20 veces menor que la correspondiente al AO (Chin *et al.*, 1995), y la DTX3 no es detectada. Sin embargo, algunos derivados del AO como son ésteres o diol ésteres, DTX4 y DTX5 presentan una afinidad similar a la del AO (Shewstowsky *et al.*, 1993).

El principal inconveniente para adoptar los inmunoensayos en el control sanitario de ficotoxinas es la falta de respuesta de algunas toxinas, el desconocimiento de las reacciones cruzadas y la dificultad de obtener una correlación satisfactoria entre la reacción inmunológica y la toxicidad real de las muestras. En contrapartida, la gran sensibilidad de los ensayos inmunológicos permite importantes aplicaciones como por ejemplo la localización de las toxinas en diferentes compartimentos de las células o de los tejidos así como el análisis de muestras clínicas para el diagnóstico de intoxicaciones. Además, la posibilidad de diseñar y desarrollar algunos de estos ensayos en formatos muy sencillos de fácil aplicación, por ejemplo en la forma de bastoncillos (“sticks”) (Laycock *et al.*, 2006), hace que puedan ser fácilmente utilizados para hacer análisis cualitativos o semi-cuantitativos en el campo, sin necesidad de trasladar las muestras al laboratorio.

Tanto las pectenotoxinas como las yesotoxinas no reaccionan con ninguno de los anticuerpos anteriormente mencionados y por tanto no son detectadas mediante estos inmunoensayos. La detección de la DTX3, en cualquiera de las versiones del inmunoensayo requiere una hidrólisis previa antes de su determinación.

Ensayos celulares

La detección y cuantificación de toxinas marinas en extractos obtenidos a partir de microalgas o de alimentos puede realizarse mediante ensayos celulares que permiten detectar, cualitativa o cuantitativamente, una respuesta tóxica en células mantenidas en cultivo y expuestas a las toxinas. La respuesta celular, se basa en las propiedades bioquímicas o fisiológicas de las toxinas que pueden ser comunes a toxinas que presenten diferentes estructuras moleculares, de ahí que a menudo estas respuestas sean inespecíficas.

Se han desarrollado diversos ensayos para detectar una respuesta celular tóxica al ácido okadaico, utilizando observaciones microscópicas y/o cuantificaciones colorimétricas. Aune *et al.* (1991) utilizaron hepatocitos de rata para la evaluación de la respuesta citotóxica al AO por microscopía óptica y electrónica de barrido. La observación de alteraciones morfológicas diferenciales del AO respecto a otras toxinas fue un paso hacia la especificidad parcial del ensayo. Diferentes modelos celulares fueron propuestos con posterioridad. Amzil *et al.* (1992) obtuvieron una correlación positiva entre los resultados del ensayo celular y la cuantificación del AO por HPLC, si bien no se contempló la especificidad del ensayo. Fessard *et al.* (1994) describieron con un ensayo de fibroblastos una nueva respuesta morfológica al AO, que fue más tarde completada con un ensayo más específico basado en el análisis de las alteraciones del citoesqueleto de actina (Diogene *et al.*, 1995). La especificidad de la respuesta al AO puede ser mejorada si durante la etapa de purificación de la muestra se utilizan protocolos que excluyan otro tipo de toxinas. Algunos de los ensayos anteriormente descritos para el AO han sido utilizados para la detección de otras toxinas. Este es el caso de los trabajos de Aune *et al.* (1991) con la DTX1, la PTX1 y la Yesotoxina y de Diogène *et al.* (1994) con la maitotoxina (MTX). Así, Aune ha descrito diferencias entre las actividades o alteraciones morfológicas provocadas por el AO, DTX1, PTX y YTX, evidentes en microscopio electrónico de barrido pero más confusas con microscopio óptico.

Tubaro *et al.* (1996) desarrollaron un ensayo cuantitativo de citotoxicidad para la determinación de AO en mejillones basado en la utilización de células KB (carcinoma epidérmico humano) con un límite de detección de 50 $\mu\text{g AO Kg}^{-1}$. El ensayo está basado en la conversión metabólica del colorante MTT (tetrazolium) dando lugar a un producto de color azul cuya absorbancia puede ser medida con un espectrofotómetro de “scanning” de microplacas.

Los ensayos celulares han demostrado su utilidad en investigación y resultan fundamentales para elucidar el mecanismo de acción de moléculas con actividad biológica, y en particular de toxinas, siendo utilizados rutinariamente en toxicología como etapas obligadas en el largo proceso de validación de fármacos para poner en evidencia actividades biológicas de interés y efectos secundarios no deseables. A esta gran ventaja cabe añadir propiedades suplementarias tales como una alta sensibilidad, la posibilidad de multiplicar fácilmente el número de muestras examinadas, una relativa sencillez y la posibilidad de reducir el número de animales empleados en los bioensayos con animales. Uno de los principales inconvenientes proviene de las dificultades para replicar los resultados en distintos laboratorios. De todas formas, es de esperar que dichos modelos puedan ser utilizados en un futuro para la detección y cuantificación de toxinas marinas en programas de control sanitario en la medida en que se realicen estudios rigurosos de validación..

4.4. Métodos químicos

Cromatografía líquida de alta eficacia asociada a detección fluorimétrica

Dentro de los métodos químicos de detección de toxinas, la cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a la detección fluorimétrica (HPLC-FD) ha sido ampliamente utilizada durante muchos años para la determinación de los diferentes grupos de toxinas lipofílicas. Debido a la falta de cromóforos en la molécula, la mayor parte de los métodos se han basado en la derivatización química precolumna de las toxinas por reacción de los extractos con reactivos fluorescentes que, tras su posterior separación en la columna cromatográfica, son detectados como derivados fluorescentes de las toxinas.

Se han descrito un amplio número de reactivos fluoróforos que pueden reaccionar con el grupo carboxilo del ácido okadaico y el de sus análogos (DTX1, DTX2). Entre ellos, el 9-antril-diazometano (ADAM) (Lee *et al.*, 1987), ha sido el más ampliamente utilizado debido a su selectividad y sensibilidad. El límite de cuantificación está alrededor de 100 ng g⁻¹ de tejido o 10-20 ng g⁻¹ en el caso de que se utilice la glándula digestiva como muestra para el análisis. Este método se aplicó con éxito en la determinación de AO y DTXs en mejillones, arrastres fitoplanctónicos y en células aisladas en varias contribuciones de esta tesis doctoral

Los derivados acilados de este grupo de toxinas necesitan de una hidrólisis química o enzimática de los grupos ésteres previa a su detección fluorimétrica. En el caso de las toxinas tipo “DTX3” la dificultad de separación cromatográfica en el método de Lee (1987) es consecuencia de sus elevados pesos moleculares y alta lipofilidad, por lo que su presencia

solo puede ser investigada mediante su conversión previa a la toxina de origen mediante la hidrólisis alcalina de los extractos. Este procedimiento fue utilizado en uno de los trabajos que forman parte de esta tesis doctoral (Fernández *et al.*, 1996) y permitió la primera detección de este tipo de derivados acilados del AO en mejillones de las Rías Gallegas así como la posterior investigación, en otra de las contribuciones de esta tesis doctoral, de la presencia de derivados acilados del AO y DTX2 en mejillones, posibilitando además el estudio de la dinámica de formación y eliminación de estas toxinas (Fernández *et al.*, 1998).

En el caso de las toxinas DSP esterificadas en el grupo carboxilo, tales como los diol ésteres o compuestos del tipo DTX4 y DTX5, éstas resultan opacas en la detección directa al no estar el grupo carboxilo, necesario para la derivatización fluorimétrica, libre. Por este motivo se requiere también una hidrólisis previa ya sea de tipo químico como la anteriormente mencionada o enzimática. Quilliam *et al.* (1996) han mostrado que cuando las células se rompen durante extracciones simples con metanol acuoso, tiene lugar una hidrólisis rápida catalizada enzimáticamente de la DTX4 a los diol ésteres que, a su vez son más lentamente hidrolizados a AO, dando lugar a resultados erráticos en la determinación de las concentraciones de toxinas. Para evitar esto, los autores proponen realizar un procedimiento de extracción con una ebullición previa que restringe la hidrólisis enzimática y permite la detección del contenido original celular de AO, DTX1 y DTX2. Los mismos autores han propuesto un método de extracción mediante congelación-descongelación-hidrólisis que promueve la conversión de las toxinas esterificadas a AO, DTX1 o DTX2 y permite la valoración de manera indirecta de la contribución de dichos derivados al contenido de toxinas de tipo DSP. Estos procedimientos fueron aplicados con éxito en el estudio de los perfiles de toxinas de diferentes cepas de *P. lima* (Bravo *et al.*, 2001) y de diferentes especies de *Dinophysis* (Fernández *et al.*, 2001, 2003a, 2006) como se muestra en el capítulo I.

El método de ADAM ha sido ampliamente investigado y con el tiempo se han introducido una serie de modificaciones destinadas a mejorar la robustez del mismo (Quilliam *et al.*, 1995; 1998) y, aunque la inestabilidad del reactivo de ADAM y la posibilidad de pérdidas de toxinas durante los procesos de purificación sólido-líquido de las muestras han sido descritos como los puntos débiles de este procedimiento, un estudio en profundidad de los métodos disponibles de HPLC-FD mostró que era el más robusto (Ramstad *et al.*, 2001a, b). Entre los reactivos alternativos investigados en el estudio comparativo se encuentran el 1-Bromoacetilpireno (BAP) (Dickey *et al.*, 1993) (que mostró una mayor estabilidad pero menor sensibilidad y selectividad); varios derivados de cumarina (Shen *et al.*, 1991, Luckas *et al.*, 1992, Marr *et al.* 1994); el 2-(antraceno-2,3-dicarboximida etil-trifluorometanesulfonato

(AE-Otf) (Akasaka *et al.*, 1996b) (también utilizado para la determinación de “DTX3” (Akasaka *et al.*, 1996 a) y la luminarina-3 (James *et al.*, 1998b).

En lo que respecta a las pectenotoxinas, aquellas que poseen un grupo carboxílico libre tales como la PTX6 y la PTX7 pueden ser determinadas utilizando ADAM (Yasumoto *et al.*, 1995) en tanto que para la determinación de PTX1 y PTX4 se ha propuesto el uso de antrilcarbocianida (Lee *et al.*, 1989b). Para las yesotoxinas se ha desarrollado un procedimiento alternativo que utiliza el reactivo dienófilo DMEQ-TAD (4-[2-(6,7-dimetoxi-4-metil-3-oxo-3,4-dihidroquinoxalín) etil]-1, 2, 4-triazolino-3,5-diona) como reactivo fluoróforo (Yasumoto y Takizawa, 1997). Este mismo reactivo fue también propuesto para la determinación de PTX2 (Sasaki *et al.*, 1999).

Cromatografía líquida de alta eficacia asociada a espectrometría de masas

El desarrollo y la implementación de la cromatografía líquida de alta eficacia acoplada con la espectrometría de masas (HPLC-MS y HPLC-MS/MS) para la detección y determinación de toxinas marinas en fitoplancton y moluscos ha sido crucial en el avance del conocimiento en este campo. Además de su elevada sensibilidad, selectividad y especificidad, esta técnica permite evadir los laboriosos procesos de derivatización asociados a los métodos de HPLC-FD, al tiempo que proporciona una información estructural muy valiosa para la identificación de las toxinas conocidas o para la detección de toxinas desconocidas. En efecto, aunque al igual que en los otros métodos se requiere la disponibilidad de estándares a efectos de calibración y cuantificación, la cromatografía líquida asociada a la espectrometría de masas nos proporciona una información estructural relevante que permite establecer la presencia de congéneres o compuestos relacionados aunque solo se disponga de patrones de la toxina cabeza de serie.

Existen diferentes tipos de espectrómetros de masas disponibles comercialmente (cuadrupolo sencillo, triple cuadrupolo, trampa iónica, etc) que difieren principalmente en la sensibilidad y en la capacidad para fragmentar los iones, proporcionando información estructural y una detección selectiva de las toxinas. La denominada ionización con electrospray (ESI) es la fuente de ionización a presión atmosférica (API) más utilizada para la detección de toxinas marinas, si bien otras fuentes tales como la ionización química a presión atmosférica (APCI) han sido también utilizadas para la determinación de este tipo de moléculas. Se han desarrollado diferentes métodos que difieren en la fase móvil, tipo de tampón, pH, fuerza iónica, fase estacionaria y modo de utilización de la fuente ESI (positivo ó negativo) para la detección del ácido okadaico, DTX1 y DTX2, (Pleasant *et al.*, 1990, 1992;

Quilliam *et al.*, 1995; Draisci *et al.*, 1998b; Suzuki and Yasumoto, 2000) “DTX3” y diol ésteres (Hu *et al.*, 1992b; Marr *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 2004), pectenotoxinas (Suzuki *et al.*, 1998; Suzuki and Yasumoto, 2000), Yesotoxinas (Draisci *et al.*, 1998b) y azaspirácidos (Ofuji *et al.*, 1999; Draisci *et al.*, 2000). El método de Ofuji (1999) ha sido aplicado con éxito en varios trabajos que forman parte de esta tesis doctoral para la determinación de pectenotoxinas, ácido okadaico y DTX2 en arrastres fitoplanctónicos, en células aisladas por micromanipulación, de diferentes especies de *Dinophysis* y en extractos de hepatopáncreas de mejillón (Fernández *et al.*, 2003a, 2006).

Un aspecto importante que debe ser considerado en la aplicación de estas técnicas es que la eficiencia de la ionización de los analitos puede verse afectada de manera significativa debido a diferentes componentes de la matriz que pueden coeluir con las sustancias de interés, bien por una inadecuada separación cromatográfica, bien por ser acumulados en la columna cromatográfica después de sucesivas inyecciones. La inclusión de procesos intermedios de limpieza y purificación de las muestras mediante extracción en fase sólida se ha utilizado para eliminar el efecto de la matriz (Ofuji *et al.*, 1999; Suzuki and Yasumoto, 2000). La magnitud de las interferencias puede variar en función de las diferentes matrices. Este efecto ha sido descrito por Ito and Tsukada (2001), que concluyeron que la supresión de la eficiencia de la ionización originada por sustancias co-eluyentes podía causar variaciones significativas en la respuesta del detector, dificultando la cuantificación mediante el simple uso de soluciones puras de estándares. Se ha sugerido el método de adición para la cuantificación de las toxinas DSP (Stobo *et al.*, 2005).

La cromatografía líquida de alta eficacia acoplada con la espectrometría de masas está empezando a ser utilizada en los programas de monitorización de toxinas lipofílicas en países como Nueva Zelanda para la gestión de las zonas de producción de bivalvos (McNabb and Holland, 2003) y como complemento del bioensayo en ratón en algunos países de la UE (Hess *et al.*, 2003).

5. ACUMULACION, TRANSFORMACIÓN Y ELIMINACIÓN DE LAS TOXINAS DSP

El objetivo principal de un programa de control de toxinas en los moluscos en las aguas de producción es la protección de la salud pública y de los recursos explotables. Adicionalmente, es importante adquirir capacidad de predicción que permita a las autoridades competentes y a los sectores productivos conocer con cierta anticipación el inicio de los episodios tóxicos y

predecir su severidad y duración, para de esta manera establecer las estrategias más adecuadas de cara a la producción y la protección de los consumidores.

Para ello, además de determinar las especies potencialmente productoras de toxinas y controlar tanto su presencia en el plancton como el perfil y contenido celular de las mismas, es necesario conocer los procesos de acumulación, transformación y eliminación que sufren estos compuestos una vez que son ingeridos por los bivalvos. Ello es de vital importancia para predecir el desarrollo y evolución de los episodios tóxicos y para minimizar sus consecuencias.

5.1. Contenido de toxinas por célula

El tipo y contenido de toxina por célula de dinoflagelado depende de la especie y dentro de ella, se observan grandes diferencias en función de las poblaciones y de las condiciones fisiológicas (Lee *et al.*, 1989a; Subba Rao *et al.*, 1993; Andersen *et al.*, 1996; Johansson *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1997; Fernández *et al.*, 2001). Existen abundantes referencias en la literatura sobre estimaciones de contenido de toxina por célula de *Dinophysis* spp. Al no existir cultivos establecidos de éste género de dinoflagelados, las estimaciones se han hecho a partir de arrastres de red de poblaciones naturales, de arrastres mantenidos en laboratorio un corto período de tiempo y, en casos excepcionales, a partir de laboriosos aislamientos de células individuales mediante micromanipulación de poblaciones naturales al microscopio óptico. En estudios muy recientes, Parker *et al.* (2006) han conseguido cultivos densos, de pequeña escala, de la especie mixótrofa *Dinophysis acuminata* alimentada con el ciliado *Mesodinium rubrum* (= *Myrionecta rubra*). El ciliado a su vez requiere aportes de microalgas criptofíceas del género *Teleaulax*. Se trata de cultivos incipientes, mucho más complejos de mantener que los cultivos masivos de especies autótrofas con medios de cultivo estándares. No obstante, el hallazgo de Park *et al.* (2006) ha supuesto un enorme avance que abre avenidas para futuros estudios sobre la fisiología y producción de toxinas de *Dinophysis* spp.

Los primeros intentos de correlacionar el número de células de *Dinophysis* y la toxicidad en moluscos revelaron una gran variabilidad inter e intra específicas en el contenido de toxinas de las especies fitoplanctónicas (Haamer *et al.*, 1990; Dahl *et al.*, 1995). Se han observado diferencias de uno o dos órdenes de magnitud para una misma especie dentro de la misma área (Lee *et al.*, 1989 a; Subba Rao *et al.*, 1993; Blanco *et al.*, 1995; Johansson *et al.*, 1996; Andersen *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1997). Estas variaciones han sido

también resaltadas a lo largo de estudios que forman parte del capítulo I de esta tesis doctoral (Fernández *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2006).

Las diferencias geográficas entre poblaciones de la misma especie son muy grandes. Así, *D. acuminata*, responsable de cierres frecuentes y prolongados en zonas costeras europeas produce problemas muy leves en Japón, por su bajo contenido tóxico (Lee *et al.*, 1989 a; Yasumoto *et al.*, 1990). Dejando aparte consideraciones genéticas y fisiológicas, el contenido en toxinas parece estar afectado por otros factores todavía no bien definidos, entre los que no debe ser obviado el que algunas discrepancias notables en la cuantificación del contenido de toxina de células de *Dinophysis* estén relacionadas con el tratamiento de las muestras previo al análisis. Como ejemplos representativos, Masselin *et al.* (1992) compararon la toxicidad celular de *D. sacculus* estimada a partir de arrastres multiespecíficos y a partir de aislamientos de células individuales, observando que los datos obtenidos de los arrastres eran hasta de un orden de magnitud inferiores a los obtenidos de células aisladas por micromanipulación. Asimismo, en un estudio que forma parte de esta tesis doctoral (Blanco *et al.*, 1995) se estimó el contenido de toxina por célula y especie de *Dinophysis* mediante regresiones múltiples de los resultados de toxicidad y el conteo de células de las distintas especies de *Dinophysis* en arrastres de red multiespecíficos. Estos estudios mostraron que la toxicidad estimada por célula era tanto mayor cuanto más se diluían los arrastres fitoplanctónicos excesivamente densos antes del análisis por HPLC.

De forma general se pueden citar como posibles fuentes de imprecisión las siguientes:

- Perturbaciones del material acompañante, que dan lugar a cromatogramas con mucho “ruido químico” que dificulta la cuantificación;
- Posible pérdida de toxinas, ya sea por roturas de las células en los arrastres fitoplanctónicos densos o por liberación de toxinas al agua por parte de las células, en cuyo caso pasan de filtrado. En estos casos obtendríamos una subestimación de la toxicidad original.
- Incremento del contenido en toxinas debido al stress celular causado por el aislamiento (principalmente debido a la hidrólisis de compuestos esterificados debido a procesos autolíticos asociados al stress celular químico o mecánico).

Esta segunda hipótesis ha sido estudiada recientemente (Johansen and Rundberget, 2006), aunque en el caso de las células de *Dinophysis* ya se había observado con carácter general que cualquier proceso que ocasione estrés celular o, simplemente, su mantenimiento

en condiciones de laboratorio puede causar un incremento en el contenido celular de toxinas (Fernandez *et al.*, 2001).

Resultados previos sobre la estimación de toxicidad de células de *Dinophysis* spp han puesto de manifiesto que existe una gran variabilidad en los valores obtenidos para cada especie en distintas zonas del mundo o incluso en la misma localidad. Al no disponerse hasta muy recientemente de cultivos de estas especies, resulta difícil determinar si esta variabilidad está genéticamente determinada; si se debe a que estamos trabajando con cepas distintas de toxicidad muy diversa; si son las condiciones ambientales las que influyen a través de cambios en los procesos metabólicos o si simplemente es la tasa de crecimiento o el biovolumen los factores que producen las diferencias detectadas. En el caso de *D. acuminata*, el problema se complica por la gran variabilidad morfológica que presenta esta especie. Es necesario, pues, obtener repetidas estimaciones de toxicidad por célula en series temporales durante distintas estaciones del año y relacionar estos valores con el tamaño/forma de las células, y aún mejor, acompañar estos estudios de otros que determinen la variabilidad genética de las células procedentes de distintos episodios.

5.2. Toxinas producidas

El perfil de toxinas es también muy variable, pero la mayor parte de los estudios realizados deben ser interpretados con cierta precaución. Además de las principales toxinas DSP (AO, DTX1 y DTX2) en las que el grupo carboxilo está libre, se han detectado en los dinoflagelados bentónicos *Prorocentrum lima* y *Prorocentrum maculosum* varios derivados conjugados tales como los diol ésteres y los compuestos sulfatados solubles en agua del tipo DTX4 y DTX5 (Yasumoto *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 1992b; Hu *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1995a, 1995b). Más recientemente y en parte por los trabajos que forman parte de esta tesis doctoral, se ha sugerido su presencia en poblaciones de plancton conteniendo *Dinophysis* (Fernández *et al.*, 1998; Moróño *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2006). Su presencia ha sido demostrada en *D. acuta* (Suzuki *et al.*, 2004). La relevancia de este tipo de compuestos había sido ya puesta de manifiesto por Quilliam *et al.* (1996), que mostraron que la DTX4 podía ser la toxina principal en un cultivo de *P. lima*. Estos compuestos se detectaron sometiendo las células a un tratamiento de ebullición para prevenir su hidrólisis enzimática mediante la desnaturalización de los enzimas responsables por acción del calor. Los mismos autores observaron que la extracción mediante un tratamiento de congelación-descongelación promovía una rápida conversión enzimática de la DTX4 a diol ésteres que eran posteriormente hidrolizados a las correspondientes toxinas carboxílicas (AO, DTX1 o DTX2) a velocidad más lenta. Así pues,

la DTX4 y el enzima responsable de su hidrólisis estarían almacenadas en compartimentos celulares distintos (Quilliam *et al.*, 1996). Un proceso similar, pero no bajo condiciones controladas, puede ocurrir cuando se rompen las células en los diferentes procesos de extracción. La DTX4, se hidroliza enzimáticamente al diol éster, y éste último se hidroliza a su vez convirtiéndose en AO. Teniendo en cuenta estos procesos, es muy posible que una parte de los resultados obtenidos hasta la fecha en relación al perfil de toxinas sean fruto de la hidrólisis parcial o total de las toxinas presentes en formas conjugadas en las células de los dinoflagelados y por tanto no reflejen de manera precisa el perfil original de las células.

Siempre teniendo presente esta consideración, los resultados obtenidos hasta la fecha han mostrado que tanto las diferentes especies del género *Dinophysis* como las especies bentónicas de *Prorocentrum* contienen AO como toxina principal, ya sea en forma libre o conjugada. Sin embargo existen excepciones tales como el caso de la prevalencia de DTX1 y PTX2 en *D. fortii* en Japón (Lee *et al.*, 1989a; Suzuki *et al.*, 1997, Suzuki *et al.*, 1998; Suzuki and Mitsuya, 2001), de DTX2 en *D. acuta* en Irlanda (James *et al.*, 1997, 1998a, 1999a) de PTX12 en *Dinophysis* en Noruega (Miles *et al.*, 2004) ó PTX2 en *D. acuminata* en Chile (Blanco *et al.*, en prensa). En *Prorocentrum hoffmannianum*, *P. belizeanum* y *P. arenarium* sólo se ha detectado AO (Aikman *et al.*, 1993; Morton *et al.*, 1994, 1998; Ten-Hage *et al.*, 2000), mientras que en *P. lima*, se ha detectado AO en forma libre o conjugada como la principal toxina, DTX1 en forma libre representando un porcentaje importante del contenido total de toxinas y, en algunas cepas, una pequeña cantidad de DTX2. Uno de los trabajos que forma parte de esta tesis doctoral (Bravo *et al.*, 2001) muestra diferencias considerables en los perfiles tóxicos de diferentes cepas de *P. lima* aisladas en un área relativamente pequeña (Rías Baixas, NW Spain).

Como ya se comentó, la DTX4 y los diol ésteres son opacos a la detección fluorimétrica, ya que al no presentar el grupo carboxilo libre no pueden ser derivatizados con fluoróforos como el 9-Antrildiazometano (ADAM). Por ello su detección requiere la aplicación de espectrometría de masas acoplada a HPLC. No obstante, se puede hacer una estimación de la presencia de estos compuestos calculando la diferencia de niveles de AO entre dos muestras de células de la misma población, una sometida a un proceso de inactivación enzimática, y otra en la que se ha favorecido la hidrólisis enzimática de estos ésteres. La diferencia de AO entre ambas extracciones será un índice de la cantidad de toxina que se encontraba en forma de DTX4 y/o diol-ésteres. Este procedimiento fue utilizado en los

estudios de toxicidad de células de arrastres fitoplanctónicos (Morono *et al.*, 2003) y de diferentes cepas de *P. lima* (Bravo *et al.*, 2001) que forman parte de esta tesis doctoral.

5.3. Procesos de acumulación, transformación y eliminación de las toxinas

Los moluscos acumulan toxinas principalmente por filtración directa de las células productoras de las mismas o alimentándose de organismos contaminados, como es el caso de algunos moluscos gasterópodos. En los bivalvos, la alimentación implica varios procesos. Primero, la actividad de las branquias fuerza el flujo del agua a través de ellas de tal manera que la mayor parte de las partículas son retenidas. Seguidamente éstas son transportadas a la boca tras un proceso de selección (selección pre-ingestiva) en el que aquellas que el sistema no es capaz de retener o que son rechazadas por sus características físicas (como la densidad ó el sabor) pueden ser excluidas.

Una vez que las toxinas han sido ingeridas, pueden ser absorbidas y acumuladas como tal o transformadas. Los trabajos que forman parte de esta tesis doctoral muestran cómo estas transformaciones pueden dar lugar a un espectro complejo de compuestos de distintas polaridades y con diversas eficiencias de absorción y velocidad de eliminación, probablemente en función de su diferente capacidad para atravesar las membranas celulares. Con frecuencia, los compuestos generados poseen una toxicidad diferente a la de la toxina original, modificándose de esta manera la toxicidad del organismo que produce o acumula las toxinas sin que tenga lugar ningún proceso de adquisición o pérdida de la misma. El hecho de que la polaridad de las toxinas transformadas pueda ser diferente de la de las toxinas originales ocasiona que haya que utilizar diferentes protocolos de extracción a efectos de su detección.

5.3.1. Transformaciones en el grupo del AO y derivados

Hasta la fecha se han documentado 3 tipos de transformaciones para las toxinas del grupo del ácido okadaico: a) Hidrólisis de las formas conjugadas: compuestos tipo DTX4, DTX5 y diol ésteres, b) oxidación de diol-ésteres y c) acilación de las toxinas con el ácido carboxílico libre.

a) Hidrólisis de las formas conjugadas

El estrés celular inherente a la retención, ingestión y disrupción mecánica implicado en la adquisición y digestión de nutrientes por parte de los moluscos puede desencadenar procesos autolíticos de las especies productoras de toxinas y/o liberar sustancias de otras

especies del fitoplancton ingerido capaces de hidrolizar las toxinas más probables en el fitoplancton, esto es DTX4, DTX5 y compuestos relacionados, a diol-ésteres y otros derivados (Windust *et al.* 1997). Las esterases que intervienen en la digestión efectúan muy probablemente el mismo proceso hidrolítico sobre las toxinas que sobre los alimentos, para dar lugar, al menos en parte, a las toxinas con el grupo carboxílico libre: AO, DTX2, etc.

Se ha sugerido que la DTX4 y la DTX5 son productos *de novo* mayoritarios de *Prorocentrum lima* y que el AO y los diol-ésteres se obtendrían únicamente como productos de la hidrólisis de las toxinas sulfatadas (Hu *et al.*, 1995 a; 1995b; Bauder *et al.*, 1996; Windust *et al.*, 2000). DTX4 y DTX5 son compuestos dotados de cierta polaridad debido a los grupos sulfatos que contienen y son sólo parcialmente solubles en cloroformo (Hu *et al.*, 1995a) y hexano. Son rápidamente hidrolizados a diol-ésteres (en segundos) y a AO (horas) por la acción de enzimas autolíticas de las células que las contienen (Bauder *et al.*, 1996; Windust *et al.*, 2000) y probablemente también por la actividad de las enzimas del tracto digestivo de los organismos que se alimentan de dinoflagelados tóxicos. Todas estas circunstancias han sido probablemente la causa de que estas toxinas hayan pasado inadvertidas en muchos estudios en los que la hidrólisis y la partición líquido-líquido no estaban especialmente diseñadas para su detección. Asimismo, los procesos asociados a la manipulación y tratamiento de las muestras han podido en muchos estudios desencadenar procesos de hidrólisis que han dado lugar a la falsa interpretación de que las toxinas mayoritariamente presentes en fitoplancton son aquellas con el grupo del ácido carboxílico libre. Estudios más recientes, entre los que se incluyen contribuciones de la presente tesis doctoral (Moroño *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2006) y que no presentan estas limitaciones técnicas, sugieren que este tipo de compuestos sulfatados son también importantes en el caso de *Dinophysis* (Vale and Sampayo, 1999, Mackenzie *et al.*, 2002; Vale and Sampayo, 2002 b, Moroño *et al.*, 2003) y que también son metabolizados de diversas maneras por diferentes organismos invertebrados (Vale and Sampayo, 2002b).

Los diol-ésteres producidos por la hidrólisis de DTX4 y DTX5 son menos polares, capaces de traspasar muy fácilmente las membranas celulares (Windust *et al.* 1996; 2000) y susceptibles de ser oxidados. Los diolésteres y sus derivados oxidados pueden ser también hidrolizados dando lugar a las principales toxinas tanto por la acción de las enzimas presentes en las células cuando se produce su ruptura (Windust *et al.*, 2000) como por la de esterases inespecíficas durante el proceso de digestión en los bivalvos (Hu *et al.*, 1999). Diferentes estudios han mostrado que la capacidad hidrolítica depende de la especie de bivalvo. En la

vieira *Argopecten irradians* las formas dominantes de las toxinas DSP después de haber sido alimentada con *Prorocentrum lima* fueron los diol ésteres del AO en una proporción similar a la encontrada en las células del dinoflagelado lo que sugiere la ausencia de actividad de las esterasas durante el proceso digestivo (Bauder *et al.*, 2001). Una situación similar se encontró en 5 de 6 bivalvos estudiados en Portugal, almejas (*Venerupis pullastra* y *Ruditapes decussatus*), ostiones (*Crassostrea japonica*), berberechos (*Cerastoderma edule*) y navajas (*Solen marginatus*), que mostraron escasa capacidad para hidrolizar los ésteres del AO ya que aproximadamente el 100% de ellos mantenían su funcionalización. Sin embargo, en otra de las especies estudiadas, el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, alrededor del 50 % de la toxinas se encontró en la forma carboxílica (Vale and Sampayo, 2002b). En otra especie de mejillón, *Perna canaliculus*, se detectó una cantidad de ésteres de AO inferior a la cantidad presente en el fitoplancton utilizado para su alimentación (MacKenzie *et al.*, 2002), apoyando este hecho la idea de que los mejillones poseen una capacidad hidrolítica mayor que otras especies de bivalvos.

b) Oxidación:

En el caso de la diatomea *Thalassiosira weissflogii* se han demostrado procesos oxidativos sobre los diol ésteres que sólo afectan al radical diol dando lugar a diferentes compuestos que son más polares que la toxina original (Bauder *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1999, Windust *et al.*, 2000). Este proceso ha sido documentado para el AO pero probablemente es también aplicable a DTX1 y DTX2. Diversas enzimas tales como citocromo P-450 pueden intervenir en estos procesos (Windust *et al.*, 2000). Transformaciones similares podrían tener lugar en los moluscos ya que los procesos oxidativos son importantes componentes de la estrategia de defensa contra parásitos y xenobióticos.

c) Acilación

El grupo hidroxilo del C7 de la molécula del AO y análogos, y posiblemente el del C23, pueden estar esterificados con ácido grasos de diferente longitud, dando lugar a toda una serie de compuestos que son menos polares que las toxinas originales y genéricamente denominados “DTX3” (Yasumoto, 1985). Esta acilación fue demostrada para la DTX1 en el caso de la vieira *Patinopecten yessoensis* (Suzuki *et al.*, 1999) y muy probablemente tiene lugar también en otros bivalvos (ya que estos compuestos han sido detectados en moluscos pero no en fitoplancton) y para las otras dos toxinas principales del grupo DSP, esto es el AO y la DTX2 (Marr *et al.*, 1992; Carmody *et al.*, 1995a). Estudios que forman parte de esta tesis

doctoral se han centrado en derivados de baja polaridad de las principales toxinas DSP (no estrictamente en 7-O-Acil derivados) que probablemente incluyen otros derivados tales como diol ésteres (Fernandez *et al.*, 1998; Vale and Sampayo, 1999, 2002 b; Morono *et al.*, 2003). Algunos de estos estudios han sido capaces de discriminar diferentes clases de compuestos a través del modelado matemático y de estimar tasas de acilación en el caso de la especie de mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Blanco *et al.*, 1999; Morono *et al.*, 2003).

No existen evidencias de interconversión entre las tres toxinas principales AO, DTX1 y DTX2 así como en el caso del ácido 7-deoxi-okadaico, y la información obtenida hasta la fecha indica que no tienen lugar estas transformaciones.

5.3.2. Transformaciones de las Pectenotoxinas en los moluscos

En el caso de las pectenotoxinas existen tres vías principales de transformaciones: a) oxidación, b) apertura del enlace C1-C33 con la consecuente ruptura del anillo de lactona y c) acilación de los secoácidos.

a) Oxidación

En lo que respecta a la oxidación, se asumió en un principio que la principal pectenotoxina presente en el plancton era la PTX2 y que este compuesto sufría en los bivalvos toda una serie de transformaciones que daban lugar finalmente a PTX6, con PTX1 y PTX3 como pasos intermedios, como se pudo observar en *Patinopecten yessoensis* (Murata and Yasumoto, 1990; Suzuki *et al.*, 1998). Sin embargo, PTX6 no ha sido detectada en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* recogido en la misma área que las vieiras que acumulan esta toxina (Suzuki and Yasumoto, 2000) lo que sugiere que el proceso de oxidación requerido es dependiente de las características enzimáticas o bioquímicas de cada especie de bivalvo.

b) Ruptura del enlace C1-C33

La segunda vía de transformación de las pectenotoxinas es la apertura de la lactona por hidrólisis de la lactona C1-C33 convirtiendo las pectenotoxinas en los secoácidos correspondientes (Fig. 4).

Este tipo de transformación es el que parece tener lugar preferentemente en el caso de *Pecten novaezelandiae*, *Perna canaliculus* (Suzuki *et al.*, 2001 b, c) y muy posiblemente en el de *Mytilus galloprovincialis*, como se muestra en uno de los trabajos que constituyen esta tesis doctoral (Fernández *et al.*, 2003a).

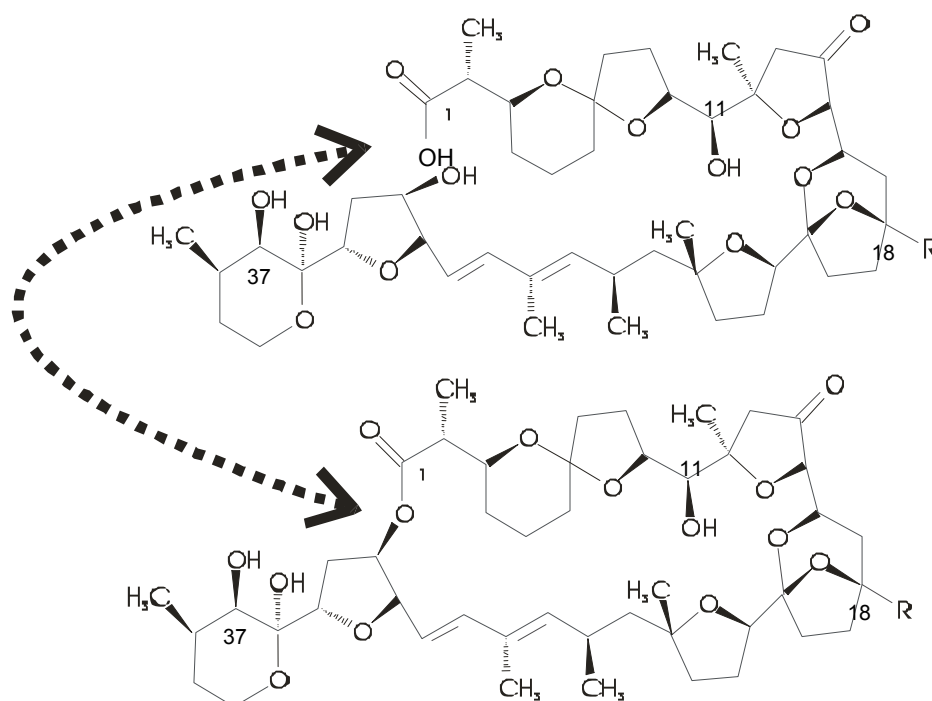


Figura 4.- Transformación de Pectenotoxinas en sus correspondientes seco-ácidos.

c) Acilación

El proceso de acilación de los secoácidos de la PTX2 ha sido descrito en mejillón (*Mytilus edulis*). Así, Wilkins *et al.* (2006) detectaron hasta tres series de ésteres de ácidos grasos del secoácido de la PTX2 y de 7-epi-PTX-2 SA. Los 37-O-Acil-ésteres del secoácido de la PTX2 fueron los más abundantes, seguidos de los correspondientes 11-O-Acil-ésteres.

Otras transformaciones inducidas por el calentamiento o tratamientos químicos pueden tener lugar y han sido descritas por Burgess and Shaw (2001).

5.3.3. Yesotoxinas

Prácticamente no existe información disponible sobre las transformaciones de las yesotoxinas. Se ha encontrado que la yesotoxina puede ser transformada en 45 OH-YTX por la acción de los mejillones *Perna canaliculus* (MacKenzie *et al.*, 2002) y *Mytilus galloprovincialis* (Suzuki and Mitsuya, 2001 a), pero con una eficiencia mayor en la segunda especie, en la que el 90 % de la YTX del alimento fue convertida a 45 OH-YTX. *Perna canaliculus* transformó menos del 10 %. En esta especie se detectaron diversos compuestos

relacionados, probablemente metabolitos de YTX no identificados hasta la fecha (MacKenzie *et al.*, 2002).

5.4. Compartimentalización

La distribución de las toxinas DSP en los diferentes órganos y tejidos de los moluscos ha sido estudiada de forma esporádica. Los primeros estudios coinciden en señalar que este tipo de toxinas se acumulan principalmente en las glándulas digestivas (Yasumoto *et al.*, 1978; 1979), lo que parece ser la situación más frecuente como se ha observado en mejillones (*Mytilus edulis*) (Pillet *et al.*, 1995; Stabell *et al.*, 1992) y en los pectínidos *Argopecten irradians* (Bauder *et al.*, 2001) y *Pecten maximus* (Hess *et al.*, 2003). Sin embargo, esta conclusión queda matizada por los resultados de Bauder *et al.* (2001) que mostraron que las vísceras (principalmente las glándulas digestivas) de *Argopecten irradians* depuraban las toxinas DSP con mucha más lentitud que el resto de los tejidos, por lo que en ellas había mayor acumulación de toxina. De hecho en el caso de *A. irradians*, el porcentaje de toxina aumentó hasta un 95% tras dos días de depuración.

5.5. Eliminación

Los moluscos no retienen las toxinas indefinidamente, de manera que, transcurrido cierto tiempo desde la interrupción de la ingestión de células tóxicas, el contenido de toxinas se hace indetectable. Dado que la mayor parte de los programas de control usan o han usado hasta el pasado muy reciente el bioensayo en ratón para la detección de las toxinas, las tasas de depuración han sido estudiadas desde la perspectiva de la eliminación de la toxicidad más que desde el punto de vista de la eliminación de las toxinas propiamente dichas. En situaciones simples, en las que sólo aparecen una o varias toxinas con tasas de depuración y potencia tóxica similar, la eliminación de toxicidad transcurre en paralelo con la eliminación de toxinas. Sin embargo, en casos más complejos, la eliminación de la toxicidad tiene una correlación pobre con la eliminación de cada una de las toxinas específicas. Las diferentes especies de moluscos depuran la toxicidad DSP, y concretamente el AO (la más estudiada de este grupo de toxinas), con velocidades de depuración diferentes.

Si bien existe una variabilidad notable entre especies, no parece que las diferencias sean tan grandes como las observadas en otros grupos de biotoxinas marinas. No existen registros de especies con un tiempo de retención tan largo como el de *Saxidomus giganteus* para las toxinas PSP (Kitts *et al.*, 1992), ó como *Pecten maximus* (Blanco *et al.*, 2002a) y *Siliqua patula* (Horner *et al.*, 1993) para las toxinas ASP. De manera similar, no se han encontrado

especies que depuren este tipo de toxinas tan rápido como lo hacen los mitílidos con el ácido domoico, como es el caso de *Perna canaliculus*, 1.97 día^{-1} (MacKenzie *et al.*, 1993), *Mytilus californianus*, $0.34\text{-}0.55 \text{ día}^{-1}$, (Whyte *et al.*, 1995), *M. edulis*, $0.49\text{-}0.99 \text{ día}^{-1}$, (Novaczek *et al.*, 1992), $2.01\text{-}10.59 \text{ día}^{-1}$ en experimentos de 1 ó 2 horas (Novaczek *et al.*, 1991), 10.59 y 2.2 día^{-1} en experimentos de 2 y 24 horas respectivamente (Wohlgeschaffen *et al.*, 1992) y *M. galloprovincialis*, $0.40\text{-}0.58 \text{ día}^{-1}$ (Blanco *et al.*, 2002b).

Las diferentes toxinas son eliminadas a diferentes velocidades. La DTX2 y sus derivados de baja polaridad “DTX3” son depuradas en *Mytilus galloprovincialis* más lentamente que el AO y sus derivados y, a su vez, cada grupo de derivados de baja polaridad presenta una tasa de depuración más baja que las toxinas de las que provienen, como se muestra en estudios que forman parte de esta tesis doctoral (Fernández *et al.*, 1998). El primer hecho sugiere que los episodios tóxicos en los que la DTX2 esté implicada se prolongarán más en el tiempo que aquéllos en los que la toxina principal sea el AO. El segundo hecho sugiere que cuando los derivados acilados se produzcan en grandes cantidades, el proceso de detoxificación será más lento.

Existe muy poca información en lo que se refiere a la depuración de DTX4, DTX5 y diol ésteres. Su desaparición en los bivalvos procede más probablemente de un proceso de hidrólisis que da lugar a las toxinas carboxílicas, que de un proceso de eliminación. La combinación de transformación y depuración de las toxinas pudiera dar lugar a cinéticas complejas y de aparente incoherencia para cada una de las toxinas cuando se analiza independientemente y a dificultades de interpretación si las cinéticas de las toxinas no son modelizadas.

5.6. Regulación de la depuración

El proceso de depuración de las toxinas está potencialmente afectado por factores ambientales tales como la temperatura y disponibilidad de alimento entre otros. Sin embargo ninguno de estos factores ha sido inequívocamente vinculado a la velocidad de depuración. En general, se asume que las bajas temperaturas dan lugar a bajas tasas de depuración (Shumway and Cembella, 2003) pero no existen evidencias sólidas que sustenten este hecho. Las tasas de depuración de mejillón en áreas de bajas temperaturas tales como Suecia o Noruega no parecen ser más bajas que las correspondientes a mejillones de España, Francia o Italia. Los intentos realizados para establecer estimaciones precisas del efecto de la temperatura y cuyos resultados forman parte de esta tesis doctoral (Blanco *et al.*, 1999) no

dieron lugar a conclusiones claras a este respecto por lo que podría concluirse que si la temperatura incide en la tasa de depuración lo hace de forma poco relevante. La salinidad tampoco parece afectar a la depuración.

Se han documentado diferencias en las tasas de depuración entre mejillones mantenidos en tanques y los que permanecieron en el mar (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1993) que fueron atribuidas a diferencias en la alimentación. Observaciones realizadas por Sampayo *et al.* (1990) durante varios episodios de DSP de las costas portuguesa sugieren que la tasa de depuración se incrementa con la concentración de fitoplancton, que es el alimento consumido por los bivalvos. La misma conclusión fue alcanzada en esta tesis doctoral (Blanco *et al.*, 1999) con mejillones gallegos, si bien el efecto registrado fue pequeño. Recientemente Svensson (2003) llegó a la conclusión opuesta, encontrando que los mejillones que no recibían alimento depuraban el AO más rápidamente que aquellos que eran alimentados. Sin embargo, el patrón de depuración de los mejillones de este experimento no siguió la típica cinética de disminución exponencial y experimentó un aumento al comienzo del experimento que sugiere que otros procesos además de la depuración podrían estar implicados (posiblemente transformaciones de derivados esterificados).

El cambio de metabolismo aeróbico a anaeróbico inducido por la emersión de los mejillones varias horas al día no produjo alteraciones en la depuración del AO y de la DTX2 (Moroño *et al.*, 1998), lo que implica que algunos de los principales procesos metabólicos de estos moluscos no afectan sustancialmente la tasa de depuración.

Como se muestra en varias contribuciones a esta tesis doctoral, parte de esta incertidumbre en relación a los verdaderos efectos de factores ambientales en la tasa de depuración radica en el hecho de que una correcta estimación requiere un sólido conocimiento conceptual y matemático de la cinética de las diferentes toxinas implicadas (Moroño *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 1999) y este conocimiento ha empezado a emerger en años recientes con el descubrimiento y la demostración de la contribución real de muy diversos compuestos al contenido total de toxinas en los bivalvos (Vale and Sampayo, 2002 b; MacKenzie *et al.*, 2001; 2002; Moroño *et al.*, 2003) y con el desarrollo de modelos matemáticos de acumulación.

5. 7. Predicción de la acumulación de toxinas DSP: Modelizado

La predicción de la acumulación de toxinas en los moluscos requiere la aplicación de modelos matemáticos. Dichos modelos están compuestos de al menos dos términos: un

término de ganancia que describe la toxina adquirida por el organismo, comenzando desde la toxina que está disponible en el medio y un término de pérdida que normalmente integra todas las vías posibles de eliminación en el término genérico “depuración”. El término de ganancia incluye todos los procesos que están implicados en la adquisición de toxinas. En los moluscos bivalvos la ganancia es usualmente reducida a pocos términos que describen la adquisición de alimento, ya que las toxinas son principalmente ingeridas con el fitoplancton tóxico que las produce y como consecuencia, otros posibles mecanismos de adquisición, tales como una absorción directa desde el agua a través de las branquias o el manto, no son tenidos en cuenta. En los modelos que se han implementado hasta la fecha, el proceso de adquisición de toxinas se describe con dos parámetros: la tasa de filtración y la eficiencia de absorción de toxinas. Los procesos de captura de alimentos, principalmente el bombeo de agua a través de las branquias, la retención en ellas, y la selección pre-ingestión son integrados en un único parámetro: la tasa de filtración, que describe la tasa con la que los bivalvos ingieren el fitoplancton. Una vez que el alimento que contiene las toxinas es ingerido, es sometido a procesos de selección pre-ingestión y digestión con el resultado de que sólo una porción de las toxinas son incorporadas al organismo. Esto se describe como la eficiencia de absorción de las toxinas. Matemáticamente, esta parte del modelo puede ser expresada de la siguiente forma:

$$d_{tox}/dt = TA \cdot FA \cdot TF \cdot EA$$

TA es la tasa de aclaramiento, FA la concentración de fitoplancton tóxico en el agua, TF el contenido de toxinas por célula de fitoplancton, y el producto de estos tres factores, la cantidad de toxina retenida por el molusco. EA es la eficiencia de absorción de las toxinas, y su producto por las toxinas retenidas da lugar a la toxina absorbida por el molusco.

La cinética de depuración de varias especies de moluscos previamente afectados por episodios tóxicos de DSP ha sido estudiada por diversos autores. En algunos de los estudios (Marcaillou-Le-Baut *et al.*, 1993; Shumway and Cembella 1993) se estableció una curva de depuración en dos fases, con tasas altas de depuración durante los primeros días, seguidas posteriormente de unas tasas de depuración mucho más lentas. En otros casos (Crocì *et al.*, 1994) se ha demostrado una única tasa de depuración para todo el proceso. Como en el caso de las toxinas PSP, estas dos respuestas pueden ser descritas por modelos de dos y un compartimento respectivamente (Silvert and Cembella, 1995, Blanco *et al.*, 1997).

En el proceso de depuración de un organismo, están implicados varios órganos y tejidos, cada uno de los cuales posee su propia tasa de depuración, de manera que un modelo ideal de

cinética utilizaría un compartimento para cada uno de los órganos/tejidos (definido por la cantidad inicial de toxinas que contiene, su tasa de depuración y las tasas de transferencia desde/hacia otros compartimentos). Estos modelos complejos son difíciles de implementar en situaciones reales debido al gran número de parámetros que han de ser estimados, lo que en muchos casos resulta imposible. En situaciones relativamente simples, cuando la mayor parte de las toxinas se acumulan en un único órgano, o cuando todos los órganos tienen tasas de depuración similares (caso poco probable), un compartimento puede ser suficiente para modelizar de forma satisfactoria la cinética, que en tal caso se conoce como monofásica.

Una situación más complicada, en la que los toxinas se distribuyen entre diferentes órganos presentando diferentes tasas de depuración, puede ser modelizada usualmente con dos compartimentos, dando lugar a cinéticas conocidas como bifásicas (incluso cuando en realidad son el resultado de dos procesos actuando simultáneamente y no un proceso actuando de manera diferente en dos fases distintas).

Teniendo en cuenta las consideraciones previas, el término de pérdida puede ser expresado de la siguiente manera:

Modelo de un compartimento:

$$d\text{tox}/dt = -K \cdot \text{tox}$$

“tox” es la concentración de toxina y K la tasa de depuración.

Modelo de dos compartimentos:

$$d\text{tox}_1/dt = -K_1 \cdot \text{tox}_1$$

$$d\text{tox}_2/dt = -K_2 \cdot \text{tox}_2 - T_{12} \cdot \text{tox}_1$$

Los subíndices indican el compartimento y T_{12} la tasa de transferencia entre el primero y el segundo compartimento.

Uno de los trabajos incluidos en el capítulo I de esta tesis doctoral (Blanco *et al.*, 1995), ha mostrado que un modelo muy simple de un compartimento puede describir de manera razonable algunos episodios de DSP en Galicia.

Cuando varias toxinas, que pueden ser transformadas unas en otras, están implicadas, los modelos resultan mucho más complejos. Sin embargo, ésta podría ser la única vía de estimar las verdaderas tasas de depuración, puesto que estudiar las toxinas como si fueran

independientes daría lugar a una infra-estimación de la velocidad de depuración de las toxinas que son el producto final de las transformaciones, como se puede observar en el caso de las toxinas DSP en dos trabajos que forman parte de esta tesis doctoral (Blanco *et al.*, 1999; Morono *et al.*, 2003) y en el caso de las toxinas PSP (Silver *et al.*, 1998).

6. GESTIÓN Y MITIGACIÓN DE LOS EPISODIOS TOXICOS

6.1. Consideraciones generales

La prevención de los riesgos de las toxinas marinas para la salud pública y para el sector productor conlleva, además del conocimiento de los organismos, de los compuestos tóxicos, y de los procesos de acumulación, transformación y eliminación de las toxinas en los moluscos, el desarrollo e implantación de una legislación que regule los requisitos básicos de los programas de monitorización y control, los niveles máximos admisibles de toxinas en los mariscos y los criterios de aceptabilidad de los métodos de ensayo y análisis para su detección y cuantificación.

Los aspectos cubiertos por los programas de monitorización y control dependen mucho del país y área geográfica considerada. En la mayor parte de los casos, los programas incluyen la vigilancia de la presencia de especies fitoplanctónicas potencialmente tóxicas (identificación y cuantificación) y la determinación del contenido en toxinas de los moluscos. Adicionalmente algunos países o regiones complementan estos datos con la monitorización de parámetros físicos, químicos y biológicos (temperatura del agua, salinidad, nutrientes, clorofila, corrientes, estratificación de la columna de agua, etc) y con el conocimiento de las condiciones oceanográficas y meteorológicas. Todo esto constituye una importante herramienta de predicción. Los distintos aspectos y características de los diferentes programas de control sanitario de toxinas se describen en el capítulo IV de la presente tesis doctoral (Fernández *et al.*, 2003c).

En lo que respecta a las regulaciones relativas al control de las toxinas históricamente incluidas en el grupo DSP, han sido objeto de gran controversia, existiendo discrepancias en lo que se refiere a qué toxinas deben ser incluidas dentro de esta clasificación y cuáles deben ser objeto de monitorización y control, así como en lo que respecta a los niveles máximos admisibles y a los métodos más adecuados para su detección y cuantificación. Como ya se ha comentado anteriormente, tradicionalmente se han incluido dentro de este grupo tres familias de toxinas -ácido okadaico y derivados, pectenotoxinas y yesotoxinas- que presentan diferente

actividad biológica. Ha existido un consenso general en la pertinencia de clasificar el ácido okadaico y derivados dentro del grupo de toxinas DSP, por sus documentados efectos diarreicos, pero ha existido un debate en la comunidad científica en lo que se refiere a la idoneidad de la inclusión de las pectenotoxinas y yesotoxinas en este grupo y en lo que respecta al riesgo que representan para la salud humana y por tanto a la necesidad o no de regulación de las mismas.

El análisis de riesgo (“risk assessment”) es la metodología fundamental para el establecimiento de los niveles máximos admisibles para este tipo de compuestos, e incluye las siguientes etapas: 1) identificación del tóxico, 2) caracterización del tóxico, 3) valoración de la exposición al mismo y 4) caracterización del riesgo (FAO/WHO, 1995). La primera etapa, conlleva la identificación de la sustancia química presente en el alimento capaz de producir efectos adversos en la salud humana. En la mayor parte de los casos, esta etapa está restringida a estudios epidemiológicos. La segunda etapa, la caracterización, consiste en la evaluación cualitativa y cuantitativa de los efectos adversos para la salud asociados a la presencia de los tóxicos en los alimentos. El conocimiento de la cinética asociada a las toxinas (procesos de absorción, distribución, metabolismo, acumulación y excreción de las toxinas y sus metabolitos) juega un papel fundamental en esta etapa. El conocimiento del mecanismo de acción y de las relaciones dosis – respuesta son también importantes a la hora de la caracterización y del establecimiento de los márgenes de protección.

La valoración de la exposición es el tercer factor a tener en cuenta en la valoración del riesgo. Esto se refiere a la evaluación cualitativa y cuantitativa de la ingesta más probable de compuestos con propiedades tóxicas a través de los alimentos. Uno de los principales problemas del uso cuantitativo de datos epidemiológicos para estimar los niveles seguros de exposición humana es que las estimaciones de exposición procedentes de dichos estudios son a menudo muy imprecisas. Se necesitan datos sobre las concentraciones de los diferentes compuestos tóxicos en los diferentes alimentos y el patrón de consumo. La exposición de los niños es en muchos casos objeto de particular atención y preocupación, debido a la relativamente alta ingesta de alimentos y a la vez a la elevada susceptibilidad en muchos aspectos.

El paso final es la caracterización del riesgo. Esto implica estimaciones cuantitativas, incluyendo incertidumbres, de la probabilidad de ocurrencia de efectos adversos para la salud en una población dada. La caracterización del riesgo debe incluir descripciones del origen de

las incertidumbres. Para compuestos no genotóxicos, la valoración del riesgo se basa en la determinación del llamado “NOAEL”, esto es, la dosis umbral por debajo de la cual no se observan valores adversos. Esta dosis se divide usualmente por un factor basado en la incertidumbre, para obtener el nivel seguro de exposición humana. Normalmente se utiliza un factor de 100 en el caso de que el NOAEL provenga de estudios con animales. Esta cifra resulta de la consideración de un factor de 10 para compensar diferencias entre animales y los humanos representativos y de otro factor de 10 para compensar las diferencias entre humanos representativos y grupos más sensibles. En el caso de que estos datos se obtengan de la extrapolación del denominado LOAEL (dosis en la que se observa el efecto adverso más leve) es posible que se aplique otro factor adicional de 10. En el caso de que estén disponibles datos robustos de intoxicación en humanos, se utiliza normalmente un factor de incertidumbre de 10.

En el caso de las toxinas marinas incluidas históricamente en el grupo DSP, no ha sido siempre posible utilizar la metodología anteriormente mencionada. Los estudios toxicológicos son escasos y han estado limitados por la escasez de toxinas puras en suficiente cantidad. Los datos sobre exposición e ingesta son también escasos o imprecisos. Esto ha dado lugar a que los límites hayan sido establecidos en un primer momento en base a los límites de detección de los métodos disponibles y posteriormente en base a los escasos datos epidemiológicos. La falta de toxinas puras y material certificado de referencia ha dificultado igualmente el desarrollo y validación de métodos adecuados de determinación. Todo esto ha ocasionado discrepancias en los métodos de detección y cuantificación utilizados y en los criterios de positividad.

A pesar de las dificultades y de las carencias y limitaciones de los datos disponibles, en los últimos años se han realizado esfuerzos considerables para racionalizar y mejorar la legislación sanitaria relativa a estas familias de toxinas, llevándose a cabo iniciativas en diferentes marcos y ámbitos que dieron lugar, primeramente a cambios significativos en la legislación europea y posteriormente a una nueva propuesta de niveles y criterios de aceptabilidad de métodos que, muy posiblemente, dará lugar a nuevas modificaciones a nivel comunitario e internacional.

6.2. Regulación de métodos de detección y de niveles máximos de toxinas DSP

Los bioensayos han sido utilizados en la mayor parte de los países para la determinación de toxinas DSP con fines de control sanitario, si bien con notables diferencias en lo que se refiere

a aspectos tales como el animal de experimentación utilizado (rata o ratón), los procedimientos de extracción y purificación, la parte del molusco utilizada para el análisis (cuerpo entero, glándula digestiva) y el criterio de positividad (muerte de los ratones antes de 5 horas o antes de 24 horas) que han dado lugar a la falta de equivalencia entre los mismos. Los diferentes bioensayos utilizados para la determinación de este grupo de toxinas han sido descritos y analizados de manera exhaustiva en uno de los trabajos que forma parte de esta tesis doctoral (capítulo III).

En relación a los niveles máximos admisibles, la mayor parte de los países los establecieron en un principio en función de los límites de detección del método utilizado, normalmente el bioensayo. En lo que respecta a la Unión Europea (UE), las Directivas 91/492/EEC y 91/493/EEC establecían las normas aplicables a la producción y comercialización de organismos marinos vivos (moluscos, crustáceos y tunicados) y de productos de la pesca respectivamente. Dichas regulaciones contemplaban el control de las áreas de producción y de las diferentes actividades de recolección, transporte, depuración, almacenamiento, procesado y comercialización, así como algunos de los requisitos microbiológicos, químicos y aquellos relativos al contenido de toxinas marinas.

Con respecto al control de toxinas DSP se establecía lo siguiente:

- Los métodos habituales de análisis biológico no deben dar reacción positiva respecto de la presencia de DSP en las partes comestibles de los moluscos (cuerpo entero o cualquier parte consumible por separado).

La Directiva era vaga, puesto que no se especificaban los métodos o los criterios de aceptabilidad de los mismos, y el límite regulatorio quedaba a expensas del límite de detección del método seleccionado. Esto dio lugar a discrepancias en los Estados Miembros en su interpretación y por tanto en los métodos de detección y en los criterios de positividad utilizados con fines de control sanitario.

En aras de conseguir la armonización de las regulaciones y establecer criterios equivalentes en lo que concierne a los métodos y límites aplicados al control de toxinas marinas, la Comisión Europea estableció una red de Laboratorios Nacionales de Referencia de Toxinas Marinas (EU-NRLs), coordinados por un Laboratorio Comunitario de Referencia, cuya nominación recayó en el Laboratorio de Sanidad Exterior de Vigo.

Las tareas asignadas a los Laboratorios Nacionales de Referencia son las siguientes:

- Coordinar las actividades de los laboratorios nacionales encargados de los análisis de toxinas en el Estado Miembro de que se trate;
- Ayudar a la autoridad competente del Estado Miembro en la organización del sistema de control de toxinas marinas;
- Organizar pruebas comparativas en los distintos laboratorios nacionales encargados de los análisis de toxinas marinas;
- Comunicar la información proporcionada por el Laboratorio Comunitario de Referencia a la autoridad competente del Estado Miembro y a los laboratorios adicionales encargados de los análisis de toxinas marinas;

Las Tareas del Laboratorio Comunitario de Referencia son las siguientes.

- Proporcionar información a los laboratorios nacionales de referencia sobre los métodos de análisis y las pruebas comparativas;
- Coordinar la aplicación de los métodos por los laboratorios nacionales de referencia mediante la organización de pruebas intercomparativas;
- Coordinar la investigación de nuevos métodos de análisis e informar a los laboratorios nacionales de referencia de los avances en este sector;
- Organizar cursos de formación y perfeccionamiento para el personal de los Laboratorios Nacionales de Referencia;
- Colaborar con los laboratorios encargados de los análisis de biotoxinas marinas en los terceros países;
- Proporcionar asistencia técnica y científica a la Comisión, especialmente en caso de desacuerdo entre los Estados Miembros sobre los resultados de los análisis.

Gran parte de la actividad de la red de laboratorios europeos de referencia de biotoxinas marinas se centró en la realización de estudios intercomparativos y en la consecución de acuerdos en cuanto a métodos de análisis de toxinas marinas y criterios de toxicidad que permitieran una interpretación común de la Directiva 91/492 y que al mismo tiempo fueran el germen de futuras regulaciones. Con el propósito de mejorar la interacción entre los laboratorios de la red, se crearon diferentes grupos de trabajo integrados por expertos y miembros de dichos laboratorios para avanzar en diversas áreas en las que se

identificaron especiales carencias. Como consecuencia de estos grupos de trabajo, que fueron auspiciados por la Comisión Europea y coordinados por el Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas, y sobre la base de sus informes técnicos, la Unión Europea adoptó la Decisión 2002/225/CE en el año 2002 que establece las condiciones específicas para la implantación de la Directiva 91/492 en lo que se refiere a los niveles máximos de ácido okadaico y dinofisistoxinas, yesotoxinas, pectenotoxinas y azaspirácidos, así como a los métodos de análisis que deben emplearse para su detección. Se aplica a los moluscos bivalvos, los equinodermos, los tunicados y los gasterópodos marinos destinados al consumo humano directo o a una transformación previa al consumo.

En lo respecta a los niveles máximos, la Decisión contempla lo siguiente:

- El nivel máximo total de ácido okadaico, dinofisistoxinas y pectenotoxinas será de 160 µg de equivalentes de ácido okadaico/kg (el cuerpo entero o cualquier parte comestible por separado).
- El nivel máximo de yesotoxinas será de 1 mg de equivalente de yesotoxina/kg (el cuerpo entero o cualquier parte comestible por separado).
- El nivel máximo de azaspirácidos será de 160 µg de equivalentes de azaspirácido/kg (el cuerpo entero o cualquier parte comestible por separado).

Esta Decisión es pionera en cuanto al establecimiento de niveles de tolerancia para las diferentes familias de biotoxinas marinas polietéreas, a la vez que armoniza su control en los Países Miembros uniformizando los criterios de positividad del bioensayo en ratón, aspecto que ha sido muy problemático en el pasado tanto desde el punto de vista de protección de la salud pública, como desde el punto de vista de agravios comparativos para el sector productor. La Decisión abre una puerta a la posibilidad de utilizar métodos alternativos al bioensayo en ratón, tales como la cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorimétrica, la cromatografía líquida acoplada a espectometría de masas o ensayos inmunológicos y funcionales como el de inhibición de fosfatasas, a condición de que, por separado o combinados, puedan detectar, como mínimo, los análogos siguientes: ácido okadaico y dinofisistoxinas (para detectar la presencia de DTX3 puede ser necesaria una fase de hidrólisis), pectenotoxinas (PTX1 y PTX2) yesotoxinas (YTX, 45 OH YTX, Homo YTX y 45 OH Homo YTX) y azaspirácidos (AZA1, AZA2 y AZA3). Establece asimismo que en el caso de que se descubran nuevos análogos importantes en relación con la salud pública, deberán incluirse en los análisis. Será necesario disponer de patrones para

poder realizar el control mediante análisis químicos y la toxicidad total se calculará mediante factores de conversión basados en los datos sobre la toxicidad de cada toxina. Las características de funcionamiento de estos métodos deberán definirse tras ser validados conforme a un protocolo acordado a nivel internacional. Cuando los resultados de los análisis efectuados demuestren que hay discrepancias entre los diferentes métodos, el bioensayo en ratones deberá considerarse el método de referencia.

Las Directivas 91/492/EEC y 91/493/EEC son dos de las 17 Directivas verticales de Seguridad Alimentaria que se desarrollaron desde el año 1964 en la Unión Europea. Como consecuencia de la publicación en el año 2000 del Libro Blanco Europeo de la Seguridad Alimentaria, se llevó a cabo una revisión de todas estas Directivas que dio lugar a su integración en un paquete legislativo de Higiene Alimentaria que entró en vigor en enero de 2006 y que contiene cinco reglamentos de aplicación en los Estados Miembros y legalmente vinculantes, de los cuales tres están relacionados con la producción de moluscos bivalvos:

- Reglamento EC No 852/2004 de higiene de los alimentos
- Reglamento EC No 853/2004 que establece las reglas específicas de higiene para los alimentos de origen animal.
- Reglamento EC No 854/2004 que establece las reglas específicas para la organización de los controles oficiales para los productos de origen animal destinados al consumo humano.

El Reglamento 853/2004 en su sección VII del Anexo establece las condiciones específicas para la producción de moluscos bivalvos, no existiendo cambios significativos en lo que respecta a las condiciones establecidas en la Directiva 91/492.

La UE contempla en la actualidad una política de eliminación de los bioensayos con animales en tanto en cuanto estén disponibles métodos alternativos validados siguiendo estudios colaborativos internacionalmente reconocidos. El Reglamento de la Comisión (EC) 2074/2005 establece que “se establecerán acciones para la sustitución de los bioensayos con animales tan pronto como sea posible”. En lo que se refiere a las toxinas lipofílicas, existe un acuerdo general en eliminar los bioensayos en ratón en la medida en que se puedan utilizar métodos alternativos que hayan sido previamente validados.

Las regulaciones existentes en otras áreas geográficas y económicas, así como otras iniciativas a nivel comunitario o internacional orientadas a la estandarización y/o

armonización de los programas de control se describen y analizan en detalle en el capítulo IV de la presente tesis doctoral.

6.3. Redes de control de los episodios tóxicos de origen fitoplanctónico en España

El establecimiento y desarrollo de los programas de control en las áreas de producción de moluscos en España, así como el control en mercado es una competencia transferida a las Comunidades Autónomas. La competencia sobre el control de toxinas en bivalvos y productos marinos de importación procedentes de Países Terceros, recae sobre los laboratorios de Sanidad Exterior que dependen orgánicamente del Ministerio de Administraciones Públicas (MAP) y funcionalmente del Ministerio de Sanidad y Consumo y que ejercen su control a través de los Puntos de Inspección Fronterizos.

El Laboratorio de la Dependencia de Sanidad en Vigo, perteneciente a la red del MAP fue nominado, en 1993, Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas (LCR), y como tal ejerció las labores de coordinación de la red de Laboratorios Europeos Nacionales de referencia de biotoxinas marinas. En la actualidad, y como consecuencia de un cambio de titularidad, el LCR está vinculado a la Agencia Española de Seguridad Alimentaria del Ministerio de Sanidad y Consumo.

En lo que respecta a la Comunidad Autónoma Gallega, el organismo oficial encargado del control de la presencia de plancton tóxico en las aguas de producción y biotoxinas en los moluscos es el INTECMAR, dependiente de la Consellería de Pesca y Asuntos Marítimos de la Xunta de Galicia que actúa como Laboratorio Oficial de la Comunidad Autónoma en la materia. El control en mercado interior es competencia de la Consellería de Sanidad.

El sistema de control de las aguas de producción de moluscos establecido en Galicia tiene como objetivo fundamental salvaguardar la salud pública y al mismo tiempo, minimizar los efectos negativos que provocan las prohibiciones de extracción en el sector productivo. El problema se aborda desde dos aspectos distintos:

a) Predicción de episodios tóxicos: la predicción de un episodio tóxico con suficiente antelación permite al sector la adopción de decisiones encaminadas a modificar su estrategia de explotación de forma que se minimicen en lo posible los efectos negativos.

b) Minimización de sus efectos: una vez desarrollado el episodio, y dado que en la actualidad no se conocen técnicas que permitan reducir o eliminar la acumulación de toxinas

en los moluscos, las medidas a tomar para la reducción de sus efectos pasan por evitar mantener las prohibiciones de extracción más tiempo del imprescindible necesario.

Con el fin de cumplimentar estos aspectos, el sistema de control tiene las siguientes características:

1. Control intensivo de las poblaciones fitoplanctónicas, y de las condiciones físico-químicas que condicionan su desarrollo (climatología, parámetros físico-químicos de las aguas, condiciones de estratificación, etc). Este control permite a corto plazo una predicción de las variaciones de toxicidad acumulada en los moluscos, y a largo plazo, mediante la combinación de toda la información disponible, la predicción de la aparición, desarrollo y desaparición de los episodios tóxicos.

2. Control intensivo del contenido de biotoxinas en moluscos que permite tener un conocimiento pormenorizado de la situación tanto de las distintas zonas de producción como de las distintas especies cultivadas. En cada zona de producción, la periodicidad del muestreo varía, en función de la situación, desde un mínimo de una vez por semana hasta diaria.

3. Actualización individualizada sobre pequeñas unidades geográficas (zonas de producción, bancos marisqueros, polígonos de bateas, etc) y frecuencia de muestreo muy intensa. De esta manera es posible garantizar que cualquier producto apto para el consumo no se verá retenido en la zona de producción más tiempo del necesario, y a la vez disminuir la variabilidad entre lotes en los mariscos comercializados, ya que se elimina de la variabilidad el componente de la localización.

4. Actualización de los Planes de Actuación que mediante una información generada por el Departamento de Condiciones Oceanográficas y Fitoplancton y el de Biotoxinas permiten disponer de información predictiva a corto plazo sobre la evolución de la toxicidad de cada una de las zonas de producción.

6.4. Estrategias para evitar o eliminar la contaminación de los moluscos

Una gran parte de las acciones descritas anteriormente (monitorización del fitoplancton tóxico y de las toxinas y establecimiento de regulaciones) están dirigidas a la mitigación de los impactos negativos de los episodios tóxicos mediante la reducción del riesgo para la salud pública. Además del establecimiento de programas de monitorización y control, se han realizado intentos de desarrollar estrategias dirigidas a evitar la contaminación de los moluscos o a eliminar las toxinas de los mismos una vez que se ha producido la

contaminación. En lo que respecta a las primeras, una de las estrategias consiste en intentar la reducción de la exposición de los moluscos a las poblaciones de fitoplancton tóxico. Esto puede realizarse mediante dos procedimientos: 1) reducir la proliferación del fitoplancton ó 2) cambiar la ubicación de los moluscos de manera que se evite su contaminación. En lo que respecta al primer procedimiento, el único método que ha demostrado hasta la fecha su eficacia es el realizado en Corea, que consiste en la dispersión de arcilla adsorbentes del plancton para evitar la proliferación de *Cochlodinium polykikroides* (Kim *et al.*, 1998), pero que presenta el inconveniente del evidente impacto medioambiental. Estrategias tales como el uso de ultrasonidos o cloro para eliminar las algas tóxicas o la aplicación de virus, bacterias, hongos o protozoos que originen la ruptura de las células tóxicas han sido experimentadas pero sólo a nivel de laboratorio y nunca en proliferaciones reales de fitoplancton. El segundo procedimiento, consiste en la relocalización de los moluscos (especialmente en el caso de cultivos) o la restricción de los cultivos a áreas o profundidades en las cuales la concentración de fitoplancton sea mínima (Desbiens and Cembella, 1993; Lodeiros *et al.*, 1998; Franzosini *et al.*, 2000).

Otra estrategia para paliar el impacto de los episodios tóxicos es la eliminación de las toxinas de los moluscos. Esto puede ser abordado mediante dos vías: la aplicación de técnicas tales como tratamientos con ozono y cloro, cambios fuertes de temperatura y salinidad, etc, que aceleren la pérdida de las toxinas y permitan al mismo tiempo obtener moluscos vivos no tóxicos o bien la aplicación de técnicas específicas de procesamiento de los moluscos que permitan obtener productos libres de toxinas. Las diferentes estrategias y procedimientos han sido estudiadas y valoradas en una de las contribuciones de esta tesis doctoral (“Management of shellfish resources”, capítulo IV).

En lo que respecta a las toxinas DSP, dicha valoración ha mostrado que el traslado de los moluscos a zonas libres de fitoplancton tóxico y con condiciones ambientales que aumenten la tasa de depuración es la estrategia más efectiva. En lo que se refiere a la eliminación de las toxinas, la evisceración de los moluscos, concretamente la eliminación de las glándulas digestivas, puede ser efectiva, pero sólo resulta rentable en aquellas especies de moluscos cuyo tamaño permita una disección fácil y cuyo valor comercial compense los costes del proceso de evisceración. La extracción de las toxinas mediante técnicas de extracción de punto crítico (González *et al.*, 2002) aparece cómo una técnica interesante para eliminar toxinas de estos grupos u otras de carácter lipofílico. La técnica requiere la deshidratación del producto por lo que sólo será útil en aquellos productos que requieran o al menos toleren dicho proceso.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los trabajos que constituyen esta tesis doctoral se desarrollaron estrechamente vinculados a mi actividad profesional en el Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas (Sanidad Exterior- Ministerio de Administraciones Públicas) y tienen por tanto un marcado carácter sanitario, abarcando tanto aspectos químicos y analíticos como aspectos de predicción, regulación y control orientados a mitigar el impacto de las toxinas en la salud pública y en las actividades económicas relacionadas con la explotación de los moluscos.

El objetivo global de esta tesis es contribuir a minimizar los riesgos derivados de las toxinas “DSP” para la salud pública y para las actividades económicas vinculadas al recurso mediante la consecución de los siguientes objetivos específicos:

OBJETIVO 1): Mejorar la capacidad de control de los episodios tóxicos DSP por medio del conocimiento de los agentes y procesos implicados: las toxinas polietéreas responsables de los mismos y las especies fitoplanctónicas que las originan.

OBJETIVO 2): Desarrollar capacidad de predicción, utilizando el conocimiento sobre las especies tóxicas y su contenido en toxinas y mediante el estudio de las capacidades de los moluscos para acumular, transformar y eliminar las toxinas que ingieren.

OBJETIVO 3): Mejorar la capacidad de monitorización y control mediante el análisis y valoración de los diferentes bioensayos para la detección de las toxinas en los bivalvos.

OBJETIVO 4) Contribuir a una mejor gestión y mitigación del impacto de las toxinas marinas en la salud pública y en la explotación de los moluscos mediante la identificación, revisión y valoración de diferentes estrategias, iniciativas y regulaciones desarrolladas en el ámbito comunitario e internacional.

DESARROLLO DE LA TESIS

DESARROLLO DE LA TESIS

En el capítulo I, que responde al objetivo 1, se presentan los trabajos experimentales asociados a la identificación de las especies fitoplanctónicas productoras de toxinas DSP en las Rías Gallegas y a la determinación de las toxinas producidas por dichos organismos, que dieron lugar a las siguientes publicaciones.

1) From *Dinophysis* spp toxicity to DSP outbreaks: a preliminary model of toxin accumulation in mussels. (1995). Blanco, J., Fernández, M., Mariño, J., Reguera, B., Míguez, A., Maneiro, J., Cacho, E. and Martínez, A. (1995). In: P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien and C. Marcaillou (eds.). Harmful Marine Algal Blooms, Lavoisier, Intercept Ltd, Paris, pp. 777-82.

2) Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from the Galician Rías Bajas. Fernández, M.L., Reguera, B., Ramilo, I. and Martinez, A. (2001). Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from the Galician Rias Baixas. In: G.M. Hallegraeff, S.I. Blackburn, C.J. Bolch and R.J. Lewis (eds). Harmful Algal Blooms 2000, IOC of UNESCO, pp. 360-3.

3) Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain). Bravo, I., Fernández, M.L., Ramilo, I. and Marínez, A. (2001). Toxicon, 39: 1537-45.

4) First report of PTX-2 in phytoplankton net hauls and mussels from the Galician Rías Bajas during proliferations of *Dinophysis acuta* and *D. caudata*. (2003). Fernández, M.L., Míguez, A., Martínez, A., Morono, A., Arévalo, F., Pazos, Y., Salgado, C., Correa, J., Blanco, J., González-Gil, S. and Reguera, B. In: A. Villalba, B. Reguera, J.L. Romalde and R. Beiras (eds). Molluscan Shellfish Safety, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, pp. 75-83.

5) Pectenotoxin 2 in single cells isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rias (NW Spain). (2006). Fernández, M.L., Reguera, B., Gonzalez-Gil, S. and Míguez, A. 2006. Toxicon, 48: 477-490.

En el capítulo II, que responde al objetivo 2, se presentan los trabajos experimentales asociados al estudio de las capacidades de los moluscos para acumular, transformar y eliminar las toxinas y los resultados de los mismos que dieron lugar a las siguientes publicaciones:

6) Okadaic acid depuration in the mussels *Mytilus galloprovincialis*: one and two compartment models and the effect of environmental conditions (1999). Blanco, J., Fernández, M.L., Míguez, A. and Morono, A. Mar. Ecol. Prog. Ser., 176: 153-63.

7) Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels.(1996). Fernández, M.L., Miguez, A., Cacho, E. and Martinez, A. Toxicon, 34: 381-7.

8) Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain. (1998). Fernández, M.L., Míguez, A., Morono, A., Cacho, E., Martínez, A. and Blanco, J. In: B., Reguera, J., Blanco, M.L., Fernández and T. Wyatt (eds). Harmful Algae, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 449-52.

9) Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata* (2003). Morono, A., Arévalo, F., Fernández, M.L., Maneiro, J., Pazos, Y., Salgado, C. and Blanco, J. (2003). Aquatic Toxicology, 62: 269-80.

En el capítulo III, que responde al objetivo 3 se presenta el análisis y valoración de los diferentes bioensayos para la detección de las toxinas en los bivalvos que dio lugar a la publicación:

10) *In vivo* assays for phycotoxins.(2003). Fernández, M.L., Richard, D.J.A. and Cembella, A. D. In: Hallegraeff, G.M., Cembella, A.D. and Anderson, D.M., (eds.). Manual on Harmful Marine Microalgae. Paris. UNESCO Publishing. pp. 347-380

Por último, en el capítulo IV, que responde al objetivo IV se presenta el análisis, revisión y valoración de diferentes estrategias, iniciativas y regulaciones para el control y gestión de los episodios tóxicos, que dio lugar a la siguiente publicación:

11) Management of shellfish resources. (2003). Fernández, M.L., Shumway, S. and Blanco, J. In: Hallegraeff, G.M., Cembella, A.D. and Anderson, D.M., (eds.). Manual on Harmful Marine Microalgae. Paris. UNESCO Publishing. pp.657-692.

En la sección final se presentan las conclusiones generales de la tesis y las perspectivas.

CAPITULO I

TOXINAS Y DINOFLAGELADOS RESPONSABLES DE LOS EPISODIOS DE TOXICIDAD DSP EN LAS RIAS GALLEGAS

INTRODUCCIÓN

El objetivo de los trabajos que constituyen este capítulo fue mejorar la capacidad de control de los episodios de toxicidad DSP por medio del conocimiento del perfil de toxinas DSP y el contenido de toxina por célula de las distintas especies de *Dinophysis* y de *Prorocentrum lima* de las Rías Gallegas, elucidando la contribución de las diferentes especies a los episodios tóxicos.

Con la excepción del primer estudio, que se centró en la investigación de la presencia de AO y DTX2, en el resto de los trabajos realizados sobre *Dinophysis* y *Prorocentrum* se persiguió no sólo investigar la presencia de las toxinas con el grupo carboxílico libre (OA, DTX1 y DTX2) sino también investigar la presencia de formas conjugadas del AO y de las dinophysistoxinas (diol ésteres y compuestos tipo DTX4 y DTX5). La presencia de este tipo de sustancias no había sido investigada hasta entonces ni en los dinoflagelados ni en los moluscos de las Rías Gallegas.

En lo que se refiere a las pectenotoxinas, no existían estudios que hubieran abordado su contribución a los episodios de toxicidad DSP en las Rías Gallegas. La puesta a punto de las técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) nos permitió la investigación de la presencia de estas sustancias en diferentes especies de *Dinophysis* y en los moluscos.

En el artículo 1 **“From *Dinophysis* spp toxicity to DSP outbreaks: a preliminary model of toxin accumulation in mussels”** se analizaron por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a detección fluorimétrica (HPLC-FD) arrastres multiespecíficos ricos en *Dinophysis* de la Ría de Pontevedra y se estimaron, mediante un análisis de regresión múltiple, los contenidos de ácido okadaico y análogos de las diferentes especies de *Dinophysis* presentes en dichos arrastres por medio de la relación entre la abundancia de las mismas en el plancton y las concentraciones detectadas de dichas toxinas. Asimismo, se desarrolló un modelo preliminar de acumulación de toxinas en los mejillones para predecir el impacto de *Dinophysis* en la toxicidad de los mismos.

En el artículo 2 **“Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from the Galician Rías Bajas”** se analizó por HPLC-FD el contenido en toxinas DSP de células de *D. acuminata*, *D. acuta* y *D. caudata* aisladas de poblaciones naturales de las Rías Gallegas durante episodios otoñales de DSP. Adicionalmente, en las muestras de *D.*

acuminata, se hicieron estudios preliminares sobre estimación indirecta de los diol ésteres y DTX4 en células aisladas individualmente, calculando la diferencia de niveles de AO entre células sometidas a un proceso de inactivación enzimática y células de la misma población en las que si se permitió la hidrólisis enzimática.

En el artículo 3 **“Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain)”** se analizaron mediante HPLC-FD 19 cepas de *Prorocentrum lima* procedentes de diferentes localidades dentro de las Rías Gallegas, determinándose tanto su contenido en toxinas con el grupo carboxilo libre como el correspondiente a sus derivados esterificados. El procedimiento de ebullición/congelación/ descongelación /hidrólisis que permite la detección de AO, DTX1 y DTX2 y la determinación indirecta de sus derivados esterificados fue aplicado durante la extracción de las toxinas.

En el artículo 4 **“First report of PTX-2 in phytoplankton net hauls and mussels from the Galician Rías Bajas during proliferations of *Dinophysis acuta* and *D. caudata*”** se investigó mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) la presencia de pectenotoxinas, AO y derivados en arrastres fitoplanctónicos y en mejillones de las Rías de Pontevedra y Vigo.

Finalmente, en el artículo 5 **“Pectenotoxin 2 in single cells isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rías (NW Spain)”** se investigó mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) la presencia de pectenotoxinas, AO y derivados en células aisladas de *D. acuta* y *D. caudata*.

Al final del presente capítulo se presenta un resumen de los resultados y discusión de los diferentes artículos que lo componen así como las conclusiones más relevantes de los mismos.

ARTÍCULO 1

From *Dinophysis* spp toxicity to DSP outbreaks: a preliminary model of toxin accumulation in mussels.

Blanco, J., Fernández, M.L., Mariño, J., Reguera, B., Míguez, A., Maneiro, J., Cacho, E. and Martínez, A. 1995. In: P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien, C. Marcaillou (eds), Harmful Marine Algal Blooms. Technique et Documentation – Lavoisier, Intercept Ltd, pp. 777-782

From *Dinophysis* spp toxicity to DSP outbreaks: a preliminary model of toxin accumulation in mussels.

RESUMEN

Entre los años 1990 y 1993 se llevaron a cabo análisis periódicos de toxinas DSP por HPLC-FD en arrastres de fitoplancton obtenidos en una estación de la Ría de Pontevedra. Si bien el AO era la única toxina cuya presencia había sido confirmada en estudios previos de fitoplancton realizados en esta región, un segundo pico cromatográfico próximo al correspondiente al AO y con un comportamiento cromatográfico similar a la DTX2 fue detectado en un 57 % de las muestras analizadas. Se ponen de manifiesto posibles interferencias analíticas que explicarían las discrepancias observadas en los resultados cuando las muestras de plancton son diluidas. Se aplicó un análisis de regresión múltiple para estimar el contenido en toxinas y sus fluctuaciones en las diferentes especies de *Dinophysis* y para relacionar el contenido total de toxinas por volumen de agua marina con los cierres y aperturas de la extracción de moluscos realizadas a través de un programa de control basado en el bioensayo en ratón. Se presenta un modelo preliminar basado en la fisiología nutricional de los mejillones, en las concentraciones de las especies potencialmente tóxicas y en la concentración y composición del seston con el objeto de predecir el impacto de *Dinophysis* spp en la toxicidad del mejillón.

FROM *DINOPHYSIS* SPP TOXICITY TO DSP OUTBREAKS:
A PRELIMINARY MODEL OF TOXIN ACCUMULATION IN MUSSELS.

J. Blanco¹, M. Fernández², J. Mariño^{3,5}, B. Reguera⁴, A. Míguez², J. Maneiro⁵, E. Cacho² and A. Martínez²

¹ Centro de Investigacións Mariñas (Xunta de Galicia), Aptdo 208, 36600 Vilagarcía de Arousa, Pontevedra, Spain. ² Ministerio de Sanidad y Consumo, Aptdo 90, 36271 Vigo. ³ Instituto Español Oceanografía, Aptdo 130, 15080 La Coruña. ⁴ Instituto Español Oceanografía, Aptdo 1552, 36280 Vigo. ⁵ Centro de Control da Calidade do Medio Mariño (Xunta de Galicia), Vilaxoán, Pontevedra.

ABSTRACT

Between 1990 and 1993, periodic analyses of DSP toxins by HPLC on plankton net hauls were carried out at a fixed station in Ria de Pontevedra (NW Spain). Although okadaic acid (OA) was the only DSP toxin confirmed in previous studies in the region, a second peak close to that of OA and with chromatographic behaviour identical to DTX2 was found in 57% of the samples. Possible analytical interferences are pointed out that would explain disagreement of results when plankton samples are diluted. A backward elimination multiple regression analysis was applied to estimate toxin content and its fluctuations in different *Dinophysis* spp, and relate the total toxicity per volume of seawater to closure and opening of mussel marketing controlled through a toxin monitoring programme based on mouse bioassays. A preliminary model is presented, based on the nutritional physiology of mussels, concentrations of potentially toxic species and the concentration and the composition of seston, is presented in an attempt to predict the impact of *Dinophysis* spp on the mussel toxicity.

INTRODUCTION

Proliferations of *Dinophysis* spp and subsequent accumulation of enterotoxins have become the main threat to the mussel industry in the Galician Rías. Market closures due to DSP usually occur in late summer and early autumn (Reguera *et al.*, 1991). But in 1991-93, peaks of *Dinophysis acuminata* and/or *D. acuta* and enterotoxins in mussels were detected throughout the year. A long term objective in noxious phytoplankton programmes based on monitoring is to be able to predict and model the intoxication and detoxification of bivalves feeding on different phytoplankton species under changing environmental conditions. For this purpose it is essential to identify the toxic species and quantify the fluctuations in their toxin content that constitute the potential toxic food available to the filter feeders. For DSP toxicity associated with *Dinophysis* spp, research is still constrained by the lack of cultures, and studies based on field samples reveal a high variability in toxin compositions, in cells of the same species from different localities and/or from different episodes within the same region (Lee *et al.*, 1989; Cembella *et al.*, 1989; Masselin *et al.*, 1992; Subba Rao *et al.*, 1993). Micromanipulation of individual cells has been used, but it is time consuming, and the changes in toxin composition that the stress may impose on the manipulated organisms has not been evaluated. In this work, the annual variability of DSP toxicity in *Dinophysis* populations in the Galician Rías, analyzed by HPLC, is examined and related with *Dinophysis* spp abundance and with opening and closure of bivalve marketing. A preliminary model based on the nutritional physiology of mussels and the seston concentration and composition is presented in an attempt to predict the impact of *Dinophysis* spp on mussel toxicity.

The Model

A model is developed, based on the main parameters of mussel nutritional physiology, that simulates the toxic potential as a function of the concentration of toxic cells and particulate matter (seston) in the sea, and the clearance (filtration) and detoxification rates. Results of the simulation for the data of one year were transformed, by means of a variable threshold, into expected market closures. The agreement of observed and predicted closure periods was optimized by varying the threshold toxicity and the detoxification rate. The formulation of the model is:

$$dT_m/dt = C_a \cdot F \cdot A - T_m \cdot D \quad T_m: \text{ if } T_m < T_i \text{ cl}=0 \quad F: \text{ if } C_{pm} < 5 \quad F=2.2 \\ \text{ if } T_m \geq T_i \text{ cl}=1 \quad \text{ if } C_{pm} \geq 5 \quad F=1.1$$

(T_m = mussel toxicity; C_a = concentration of toxic algae; F = filtration rate; A = assimilation efficiency; cl = closure, 0 = open; 1 = closed; C_{pm} = concentration of particulate matter; T_i = toxicity threshold; D = detoxification rate).

MATERIAL AND METHODS

From August 1990 to July 1991 (first part), weekly plankton samples were collected by oblique double net hauls, and the 20-100 μm (outer and inner net mesh respectively) fraction kept and resuspended in seawater before filtration. From August 1992 to May 1993 (second part) samples were collected by vertical net haul (10 μm , 0-15 m). In both cases, Lugol's-fixed aliquots were taken for phytoplankton counting. Samples were filtered (Whatman GF/C) and immediately frozen until analysis. Toxins were extracted in methanol (80%) by sonication (15 min, twice) of the filters. Extract treatment and HPLC analyses followed Lee *et al.* (1987) with slight modifications. Derivatization was done with ADAM reagent (SERVA), and OA (Boehringer) was used as standard. Characteristics of the system were: Hewlett-Packard 1050, reverse-phase Superspher 100, RP-18 (Lichro-Cart 250-4, Merck); mobile phase, Me CN:H₂O (flow 1.1 ml min⁻¹); column temperature 35°C; fluorimetric detector HP 1046A, 365nm excitation and 412 nm emission wavelength. A backward elimination multiple regression analysis was used to calculate toxicity per cell for each *Dinophysis* species. Temporal changes of toxicity within the same species were estimated by partial regressions applied to time series of 5 consecutive samplings. The correlation of different *Dinophysis* species and/or the mixture of different populations of the same species (gaps detected within the 5 samplings), prevented the use of some series. Only time series comprising the same population of a given species were used. Fitting of the model was done using field concentrations of *Dinophysis* (cells l⁻¹), and the mean toxicity estimated using the regression analysis. Values for physiological parameters in mussels were taken from Navarro *et al.* (1991), who worked in an adjacent ria presumably with similar characteristics.

RESULTS

OA was the dominant toxin in all except two samples. In 57% of cases, a second peak

appeared with chromatographic behaviour identical to that of DTX2. DTX1 was never detected. On

average, the OA:DTX2 ratio was 7.7. *D. acuta* and/or *D. acuminata* were present in all samples where a second peak appeared in the chromatogram. The relation between *D. acuta* and the hypothetical DTX2 seems clear during an unusual proliferation of this species in December 1992 when the occurrence of *D. acuta* coincided with the period

SPECIES	PERIOD OF STUDY					
	90-93		90-91		92-93	
	DSP toxin		DSP toxin		DSP toxin	
	OA	DTX2	OA	DTX2	OA	DTX2
<i>D. acuminata</i>	5.8	0.3	5.8	0.57	5	NI
<i>D. acuta</i>	NI	0.5	NI	0.4	261	169
<i>D. rotundata</i>	124	0.14	123	NI	NI	NI
<i>D. caudata</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>D. sacculus</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI

Table I. Okadaic Acid and a possible DTX2 content (pg/cell) of five *Dinophysis* spp estimated from regression analysis. (NI= not included in the regression).

when DTX2 was detected. In samples where only *D. acuminata* and OA were present, a maximum toxicity of 7.2 pg OA cell⁻¹ was estimated for this species. Table I shows the results of the backward

elimination multiple regression analysis of 5 *Dinophysis* species and levels of OA and the possible DTX2. Three species, *D. acuminata*, *D. acuta*, and *D. rotundata*, appeared as clear DSP agents. *D. sacculus* and *D. caudata* were not correlated with the toxin peaks. Toxicity per cell (pg OA), calculated for 5 different populations of *D. acuminata* and *D. acuta* are given in Table II. An extremely high toxicity content

SPECIES	Estimated toxicity (pg OA/cell)				
	17	37	7-9	5-6	1-2
<i>D. acuminata</i>	17	37	7-9	5-6	1-2
<i>D. acuta</i>	0.6	1.1-1.5	1.4-6	58	94

Table II. Toxicity per cell (pg OA) calculated from the regression analysis for five different populations of *D. acuminata* and *D. acuta*.

calculated for *D. acuta* corresponds to an unusual increase of this species in December 1992. Analyses of residuals show that most positive deviations are associated with cell maxima of *D. acuminata* in the first part and of *D. acuta* in the second part of the study. The toxicity threshold (T) for closures, was calculated from the model as 0.4 µg OA g⁻¹ of digestive gland, and the depuration rate (D), 20%. Agreement between observed and predicted closures (figure 1) is quite good when using the concentration of *Dinophysis* spp in the water and an average value of 6 pg OA cell⁻¹ (obtained from the regression analysis) (fig. 1A), and poorer when using the toxicity per cell obtained from HPLC analyses of individual samples (Fig. 1B). Because mussel marketing was already banned, prediction of the initial closure is not very accurate due to the presence of some previous unknown toxin levels in the mussels (higher than T), that was not fed into the model.

DISCUSSION

Previous works about DSP toxicity in mussels (Rodríguez *et al.*, 1989; Reguera *et al.*, 1993) and *Dinophysis* cells (Lee *et al.*, 1989) from the Galician rías only confirmed the presence of OA. But the results of this work suggest the presence of a second toxin (probably DTX2) with retention time close to that of the OA. Due to the lack of DTX2 standard, the suggestion is based on the comparison of chromatograms of Galician samples with some obtained (under the same conditions) from toxic Irish mussels with proven content of DTX2 (figure 2).

In a toxin monitoring programme developed contemporaneously at the same station, Arévalo *et al.* (1993) obtained good correlations between time of mice death (bioassay) and OA content in mussel hepatopancreas, except in cases where a second peak appeared after the OA in the HPLC analyses, and mice died when injected with OA levels much lower than those expected to cause death. The estimate of mean toxicity per cell for *D. acuminata* is close to that obtained by Lee *et al.* (1989) with micromanipulated cells. That is not the case for *D. acuta*, for which two very high values were estimated in cells from an unusual occurrence of this species in December. Previous studies (Reguera *et al.*, 1993) revealed low toxicity in mussels ($2-3 \mu\text{g OA} \cdot \text{g hp}^{-1}$) during

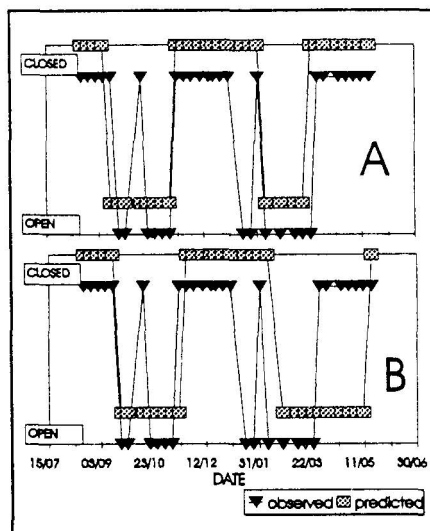


Figure 1: Observed and predicted opening and closure of mussel marketing between July 1992 and June 1993. a) Using the total concentration of *Dinophysis* in seawater and an average toxicity of $6 \mu\text{g OA/cell}$. b) Using the toxicity per cell estimated from HPLC analyses of filtered cells.

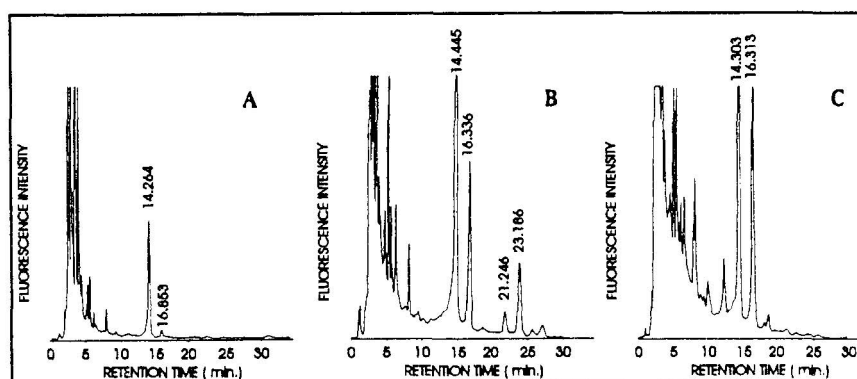


Figure 2: HPLC chromatograms of a) Okadaic acid standard; b) Toxic Irish mussel with OA and DTX2; c) Phytoplankton (net haul) sample from Ría de Pontevedra.

dense summer blooms of *D. acuta* in Ría de Pontevedra in 1990, and that toxicity associated with *D. acuminata* was higher than that associated with *D. acuta*. But

assuming that the late occurrence in December 1992 was a late intrusion of Shelf water into the rias (common in early autumn), and considering that the DSP toxin content in *Prorocentrum lima* cultures is maximal in late exponential and stationary phase (Fernández and Bravo, unpubl.), it is possible that this late population of *D. acuta* was formed by old, slow growing cells with an unusually high toxin content. Our results for *D. rotundata* differ from those obtained by Cembella *et al.*, (1989) and Masselin *et al.* (1992) who consider it as a non-toxic species in their locality, and from those of Lee *et al.*, (1989) who, in contrast, found a toxicity of 101 pg DTX1 cell⁻¹ in this species.

A very important observation during the study was that the estimated toxicity per cell was always higher when HPLC analyses were done with progressive dilutions of net haul samples with high numbers of *Dinophysis* cells (>10⁶). Masselin *et al.* (1992) found that calculated toxin content in *Dinophysis* cells from raw extracts (mixed phytoplankton populations) was lower than toxicity found in isolated cells. Both observations suggest that there might be analytical interferences caused by the associated material (from net hauled or filtered phytoplankton populations) that should be the subject of future studies. This might explain the poorer agreement between observed and predicted closures when toxicity calculated from filtered cell analyses was put into the model.

An inverse relationship between toxin levels in bivalves and amount of accompanying phytoplankton has been found by Sampayo *et al.* (1990). Nevertheless, phytoplankton concentration by itself, or chl *a* levels, are not good descriptors of the factors affecting food ingestion and assimilation in mussels. Nutritional behaviour and efficiency of mussels can be affected by several environmental variables, of which concentration and organic matter content of the seston is considered the most important (Bayne *et al.*, 1983 and 1987). The preliminary model presented here, despite being oversimplified, fits to the field data reasonably well, and supports the point that incorporation of physiological parameters of the bivalves is essential when trying to model and predict the impact of toxic phytoplankton. Similar findings were obtained by Silvert and Subba Rao (1992) for Domoic Acid intoxication. The estimated toxicity threshold for closure, assuming an average toxin content for all *Dinophysis* spp of 6 pg OA cell⁻¹ and using the mouse response curve given by Marcaillou-Lebaut *et al.* (1990), is very similar to the real one. The estimated detoxification rate is 80 to 100% higher than that given by Marcaillou-Lebaut *et al.* (1993). Presumably the environmental factors controlling mussel assimilation and detoxification processes are common, but to date there is no work relating seston concentrations and/or quality (*sensu* Bayne) to detoxification rates in field populations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank F. Amoedo, P. Garcia, I. Lemos, A. López and S. Roura for phytoplankton sampling and enumeration and the crew of R.V. "J.M.Navaz". This study was funded by project FIS89/0015-4, programme 11 of the Instituto Español de Oceanografía and by the Consellería de Pesca (Xunta de Galicia). The sample of toxic Irish mussel was kindly provided by E. Nixon.

REFERENCES

- Arévalo F., Valcárcel J.A., Domonte M., Vázquez M.J., 1994. Estudio comparativo de los resultados obtenidos por bioensayo y HPLC en la determinación de biotoxinas DSP. Datos preliminares. Actas de la III Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y biotoxinas, Vilaxoán (Pontevedra, Spain), 22-24 April 1993. Ediciones Consellería de Pesca (Xunta de Galicia).
- Bayne B.L., Newell C., 1983. Physiological energetics of marine molluscs. In "The Mollusca. V.4. Physiology Part I", ed. by Saleuddin A.S.M., Wilbur K.M.; Academic

Press; 523 p.

Bayne B.L., Hawkins A.J.S., Navarro E., 1987. Feeding and digestion by mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia: Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 111:1-22.

Cembella A.D., 1989. Occurrence of okadaic acid, a major diarrhetic shellfish toxin, in natural populations of *Dinophysis* spp from the eastern coast of North America. J. Appl. Phycol., 1:307-310.

Lee J.S., Yanagi T., Kenma R., Yasumoto T., 1987. Fluorimetric determinations of diarrhetic shellfish poisons by high-performance liquid chromatography. Agric. Biol. Chem., 51:877-881.

Lee J.S., Igarashi T., Fraga S., Dahl E., Hovgaard P., Yasumoto T., 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. J. Appl. Phycol., 1:147-152.

Marcaillou-Le Baut C., Masselin P., 1990. Recent data on diarrhetic shellfish poisoning in France. pp.487-492, in "Toxic Marine Phytoplankton", ed. by Granéli E., Sundström B., Edler L., Anderson D.M.;Elsevier, New York; 554p.

Marcaillou-Le Baut C., Bardin B., Bardouil M., Bohec M., Le Dean L., Masselin P., Truquet P., 1993. DSP depuration rates of mussels reared in a laboratory and an aquaculture pond. pp.531-535, in "Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea",ed. by Smayda T.J., Shimizu Y.;Elsevier,Amsterdam; 952p.

Masselin P., Lassus P., Bardouil M., 1992. High performance liquid chromatography analysis of diarrhetic toxins in *Dinophysis* spp from the French coast. J. Appl. Phycol., 4:385-389.

Navarro E., Iglesias J.I.P., Pérez Camacho A., Labarta U., Beiras R., 1991. The physiological energetics of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) from different cultivation rafts in the ria de Arosa (Galicia, NW Spain). Aquaculture, 94:197-212.

Reguera B., Campos M.J., Fraga S., Mariño J., Bravo I., 1991. The monitoring of Harmful Algal Blooms in Galicia (NW Spain). pp. 217-223, in "Actes du Colloque sur les Biotoxines Marines", ed. by Fremy J.M.; Centre National d'Etudes Vétérinaires et alimentaires; 233 p.

Reguera B., Bravo I., Marcaillou-Le Baut C., Masselin P., Fernández M.L., Míguez A., Martínez A., 1993. Monitoring of *Dinophysis* spp and vertical distribution of okadaic acid on mussel rafts in Ria de Pontevedra (NW Spain). pp. 553-558, in "Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea", ed. by Smayda T.J., Shimizu Y.; Elsevier, Amsterdam; 952 p.

Rodríguez J.A., Martínez A.G., Oshima Y., Sugino K., Lee J.S., Yasumoto T., 1989. Analysis of toxins in mussels from the Atlantic coast fo Spain. pp. 367-375, in "Mycotoxins and Phycotoxins'88", ed. by Natori S., Hashimoto K., Ueno Y.; Elsevier, Amsterdam; 484 p.

Sampayo M.A., Alvito P., Franca S., Sousa I., 1990. *Dinophysis* spp toxicity and relation to accompanying species. pp. 215-220, in "Toxic Marine Phytoplankton", ed. by Granéli E., Sundström B.,Edler L.,Anderson D.M.;Elsevier, New York; 554 p.

Silvert W., Subba Rao D.V., 1992. Dynamic model of the flux of domoic acid, a neurotoxin, through a *Mytilus edulis* population. Can.J.Fish.Aquat.Sci. 49:400-405.

Subba Rao D.V., Pan Y., Zitko V., Bugden G., Mackeigan K.,1993. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) associated with a subsurface bloom of *Dinophysis norvegica* in Bedford Basin, eastern Canada. Mar. Ecol. Prog. Ser. 97:117-126.

ARTÍCULO 2

Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from the Galician Rías Bajas.

Fernández M.L., Reguera, B., Ramilo, I., Martinez, A. 2001. In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (Eds), Harmful Algal Blooms, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 360-363.

Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from the Galician Rías Bajas.

RESUMEN

Dinophysis acuminata, *D. acuta* y *D. caudata* co-ocurren durante los episodios tóxicos de DSP de principios de otoño en las Rías Bajas Gallegas, siendo necesario establecer su contribución a la toxicidad de los moluscos. Los análisis de HPLC-FD de células aisladas en diferentes episodios confirmaron que *D. acuta*, con una razón OA/DTX2 de 3:2, es la fuente de la DTX2 detectada en los mejillones de Galicia y que tanto *D. acuminata* como *D. acuta* pueden ser los principales contribuyentes a los episodios tóxicos de otoño. Nuestros resultados sugieren que *D. caudata* presenta cantidades traza de AO ($< 1 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) y confirman la gran variabilidad en el contenido de toxinas de *D. acuminata* y *D. acuta* durante diferentes episodios estacionales, o incluso durante el mismo episodio, después de que las poblaciones naturales se mantuvieran en el laboratorio entre 5 y 9 días. Se discute el riesgo para la salud pública derivado de utilizar el “índice de *Dinophysis*” en sustitución de la información del bioensayo en ratón para la detección temprana de toxicidad DSP.

TOXIN CONTENT OF *DINOPHYSIS ACUMINATA*, *D. ACUTA* AND *D. CAUDATA* FROM THE GALICIAN RIAS BAJAS.

M.Luisa Fernández*, Beatriz Reguera**, Isabel Ramilo** and Ana Martínez*

* European Union Reference Laboratory on Marine Biotoxins. Aptdo. 90, 36271 Vigo, Spain

**Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo. Aptdo 1552, 36280 Vigo, Spain.

ABSTRACT

Dinophysis acuminata, *D. acuta*, and *D. caudata* co-occur during early autumn DSP outbreaks in the Galician Rías Bajas, and their contribution to shellfish toxicity needs to be established. HPLC–FD analyses of single cell isolates during different events confirmed that *D. acuta*, with an OA:DTX2 ratio of 3:2, is the source of DTX2 toxin detected in Galician mussels, and that either *D. acuta* or *D. acuminata* can be the main contributors to autumn toxic outbreaks. Our results suggest that *D. caudata* has trace amounts of OA (<1 pg · cell⁻¹) and confirm the large variability in toxin content in *D. acuta* and *D. acuminata* during different seasonal outbreaks, or even during the same outbreak after natural populations were maintained in the laboratory for 5-9 days. The risk to human health of using a “*Dinophysis* index” as substitute information for the standard mouse bioassay in the early detection of diarrhetic shellfish toxicity is discussed.

INTRODUCTION

Species of *Dinophysis* cause recurrent DSP outbreaks in Galicia and long closures of bivalve marketing in a region with an annual production over $2 \cdot 10^5$ t of mussels [1-3]. *Dinophysis acuminata* is always present in the Galician Rías Bajas, and may cause DSP outbreaks from May to October or even the whole year. *Dinophysis acuta* and *Dinophysis caudata* have a marked seasonality and are associated (if any) with DSP outbreaks from September to November. *D. acuminata* and *D. acuta* can reach levels of $1\text{--}2 \cdot 10^4$ cell · l⁻¹, whereas *D. caudata* occurs in moderate concentrations (200 cell · l⁻¹), rarely exceeding 10^3 cell · l⁻¹. Large variations in bivalve toxicity related to *Dinophysis* spp concentrations are attributed partly to interspecific and intraspecific variations in toxin content of *Dinophysis* cells (Table I). The main objectives of this study were:

- To obtain the toxin profile and the toxin content per cell in different species of *Dinophysis* causing DSP outbreaks in Galicia.
- To investigate the presence of conjugated forms of OA (diol-esters and DTX4).
- To evaluate the contribution of each species during toxic outbreaks associated with multispecific populations of *Dinophysis*.
- To find possible relations between toxin content per cell and different morphotypes of *D. acuminata* occurring throughout the year.

METHODS

Vertical and oblique plankton net-hauls (20-100-μm fraction) were made during different DSP events in the Galician Rías. Single cell isolation of *D. acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* was made by microcapillary manipulation under an inverted microscope (25 X and 100 X). Cells were transferred several times through drops of filter-sterilized seawater (Millipore, 0.22 μm), and finally filtered on preheated (400°C, 6h) Whatman

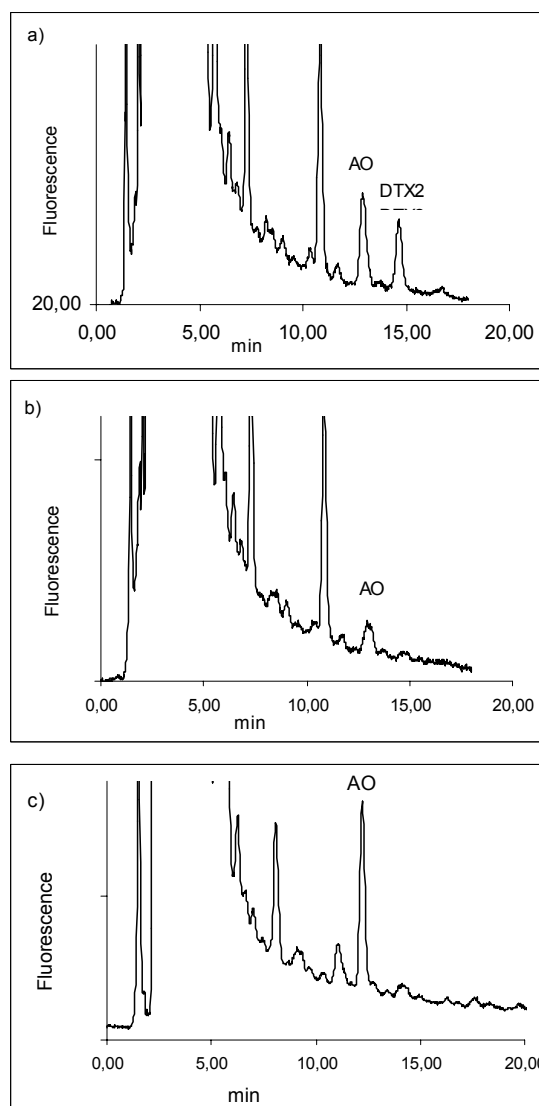


Figure 1 HPLC chromatograms obtained from extracts of a) *D. acuta*; b) *D. acuminata*; c) OA standard.

glass fibre filters (1.2 μm , 2cm). For analyses of whole population extracts, net-hauls were filtered on board and immediately kept in the deep freeze. An aliquot was taken and fixed with neutral formaldehyde for species quantification.

Table II shows the number of cells isolated for each analysis. In the case of *D. acuta*, cells were isolated on the day of collection, and 5 and 9 days after being maintained in a culture chamber (L:D 14:10; 15°+ 1°C). Most samples were analyzed following the procedure of Lee et al. [4] with slight modifications. A double extraction of each filter was performed by sonification in 2 ml of methanol (80%). After addition of half a volume of water to each volume of aliquot of the previous extract, a double extraction with 1.5 volumes of chloroform followed. In the samples of *D. acuminata* from June'98 the boiling and the freeze/thaw procedures developed by Quilliam et al. [5] for *Prorocentrum lima* cultures were applied: the first method, to destroy the enzymes of *Dinophysis* cells and prevent hydrolysis of potentially present conjugated forms of OA; the second method, to allow the enzymatic hydrolysis of OA conjugated forms. Derivatization was performed with ADAM reagent (SERVA). Characteristics of the system were: Hewlett-Packard 1050, Merck Superspher 100-RP18 (4 **mi**, 250 x 4 mm); mobile phase MeCN:H₂O (80:20); 1.1 ml min⁻¹ flow; column temperature 35°C; fluorescence detector HP 1046 A with excitation and emission waves of 365 and 412 nm respectively. Standards used were OA (NRC, Canada) and DTX2 kindly provided by K.James (Cork, Ireland). The coefficient of variation (C.V) of the analyses was lower than 10%.

RESULTS

Figure 1 shows specimen chromatograms obtained from the *Dinophysis* extracts and from the standards. Table II show the main results on toxin content per cell and species.

Dinophysis acuminata: OA was found in all samples. Significant differences, indicating the presence of conjugated forms of OA in the cells were not found in the samples from June'98 (9.9 and 7.9 pg OA · cell⁻¹ respectively) subjected to the two extraction protocols. A very small peak with retention time corresponding to DTX2 was found. Cells from September showed a toxin content more than double (21.7 pg OA · cell⁻¹) that found in the June cells.

Dinophysis acuta: OA and DTX2 were found in the three samples. The OA:DTX2 ratio was 3:2 except in the samples from specimen that were maintained longer in the culture chamber. Important quantitative differences were found in the cells isolated as soon as they were collected at sea (10.7 pg · cell⁻¹) and those which were maintained in the laboratory (55.1 and 24.1 pg · cell⁻¹). In extracts from net-haul populations where *D. acuta* was

the overwhelmingly dominant *Dinophysis* species, OA and DTX2 were found in similar proportion, but total toxin content in cells from that year's episode were much lower (0.6 – 4 pg · cell⁻¹) [2].

Dinophysis caudata: The sample chromatogram exhibited a small peak with the same retention time as OA that can be interpreted as traces of OA (0.7 pg OA · cell⁻¹).

DISCUSSION

These results show for the first time that Galician populations of *D. acuta* contain DTX2, and that this is the main species associated with the presence of this toxin in Galician mussels [6]. OA and DTX2 have also been found in *D. acuta* populations in Ireland [7] and in Portuguese mussels associated with the occurrence of *D. acuta* [8]. An OA:DTX2 ratio of 3:2 has been found in plankton net-hauls where the dominant species of *Dinophysis* was *D. acuta*, and in isolated cells, except in those stressed after several days maintained in the laboratory. The lowest toxin content per cell found in 1990, may be explained partly by a dilution effect of the toxicity in populations with a higher growth rate during a year with unusual high concentrations of this species, and partly because of the lower toxin content per cell estimated from net-haul extracts due to the matrix and other effects [9]. Regarding *D. acuminata*, although esterified toxins have not been found in the sample tested in this study by the boiling and the freeze/thaw procedures, the possibility of minor concentrations of OA being present in *Dinophysis* cells as diol-esters or DTX4-type compounds should not be discarded, because esterified OA has been found in Galicia in net-haul extracts where *D. acuminata* was the dominant dinoflagellate [10]. For the first time, isolates of *Dinophysis caudata* have been analyzed, showing trace amounts of OA. Blanco et al. [11] obtained a negative correlation coefficient for *D. caudata* from multiple regression of HPLC analyses of net-hauls containing a mixture of *Dinophysis* spp and other microplanktonic organisms [11]. *D. caudata* seems to have a minor rôle in autumn DSP toxicity in Galicia, but further tests need to be done to confirm these preliminary results.

Differences in *Dinophysis* cell numbers of at least one order of magnitude have been found in samples collected at the same station within 24 h [12], and toxicity concentrated by the bivalves is largely determined by the proportion that toxic microalgae represent from the total food available [2]. These new data on variability in toxin content per cell of *Dinophysis* together with the problems mentioned above, and the well known sampling problem of planktonic species which are not very abundant and distributed in a patchy fashion, further weaken the value of a "*Dinophysis* index" as a substitute for the compulsory mouse bioassay in the detection of diarrhetic shellfish toxins associated with *Dinophysis* blooms.

Table I. Concentration of diarrhetic shellfish toxins (OA and DTXs) in natural populations of *D. acuminata* and *D. acuta* from different parts of the world (nd = not detected).

Species	Locality	Toxin	Toxin Content (pg · cell ⁻¹)	Sampling Procedure	Refer.
<i>D. acuminata</i>	Le Havre, France.	OA	1.6	Single cell isolation	[4]
	Bay of Tokyo, Japan	OA	Traces		
	Gulf of St. Lawrence, Canada	OA	25.5	Single cell isolation from net-hauls kept in the laboratory	[13]
	Gulmar Fjord, Sweden	OA	1.1 - 23.2		[14]
		DTX1	nd - 0.2		
	Galicia, Spain	OA	1 - 37	Average toxicity estimations from multiple regression analyses of net-haul extracts.	[2]
	Denmark	OA	nd - 40	Average toxicity estimations from net-haul extracts	[15]
<i>D. acuta</i>	Galicia, Spain (Oct. 87)	OA	9.4	Single cell isolation	[4]
	Cork, Ireland (Aug. 96)	OA	58		[7]
		DTX2	78		
	Gulmar Fjord, Sweden	Total	4 - 21	Single cell isolation from net-hauls kept in the laboratory	[14]
		OA	nd - 14		
		DTX1	nd - 7		
	Galicia, Spain	Total	0.4 - 430	Average toxicity estimations from multiple regression analyses of net-haul extracts	[2]
		OA	0.6 - 94		
		DTX2	0.5 - 169		

Table II. Toxin content (pg · cel⁻¹) in single cell isolates from natural populations of different species of *Dinophysis* from the Galician Southern Rías.

Species	Sampling Date	Isolation Date	Number of cells isolated	Nº of cells injected	Toxin Content (pg · cel ⁻¹)
<i>D. acuminata</i>	18.06.98	06.98	461	201	9.9 OA
			491	199	7.9 OA
	8.09.98	9.09.98	857	246	21.7 OA
<i>D. acuta</i>	9.10.97	10.10.97	1250	308	10.7
					6.3 OA
					1.4 DTX2
	9.10.97	14.10.97	1214	412	OA: DTX2 = 3:2
					55.1
<i>D. caudata</i>	9.10.97	16.10.97	534	175	33.1 OA
					22.0 DTX2
					OA: DTX2 = 3:2
<i>D. caudata</i>	9.10.97	10.10.97	1388	342	24.1
					18.4 OA
					5.7 DTX2
					OA:DTX2 = 3:1
					0.73 OA

Table III. Estimated toxin content ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) per cell of *Dinophysis* from net-hauls where *D. acuta* was the overwhelmingly dominant species.

<i>Dinophysis</i> cells in the filters	Sampling Date	Toxin Content ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$)
<i>D. acuta</i> (507934); <i>D. acuminata</i> (75044); <i>D. caudata</i> (5300)	28.08.90	2.6 OA:DTX = 1.6
<i>D. acuta</i> (26928); <i>D. caudata</i> (528)	2.10.90	4.0 OA: DTX2 = 1.5
<i>D. acuta</i> (45425); <i>D. caudata</i> (7820); <i>D. rotundata</i> (115)	22.10.90	0.6 OA: DTX2 = 1.5

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the “Centro de Control da Calidade do Medio Mariño” (Xunta de Galicia) for monitoring information; Elena Ávila for her technical support; and the crew of R.V. “J.M. Navaz” for their helpful cooperation. This work was supported with funds from projects MAR98-0978 and MAR99-0224 (CICYT, Spain).

REFERENCES

1. B. Reguera, I. Bravo, C. Marcaillou-Le Baut, P. Masselin, M.L. Fernández, A. Míguez and A. Martínez, in: Smayda T.J., and Shimizu Y. (Eds.) Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 553-558 (1993).
2. J. Blanco, M.L. Fernández, J. Mariño, B. Reguera, A. Míguez, J. Maneiro, E. Cacho and A. Martínez, in: Harmful Marine Algal Blooms, P. Lassus, G. Arzul, E. Erard-Le Denn, P. Gentien and C. Marcaillou-Le Baut C., eds., Lavoisier, Paris, pp. 777-782 (1995).
3. J. Blanco, A. Morono, Y. Pazos, J. Maneiro and J. Mariño, in: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández and T. Wyatt, eds., Harmful Algae, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers, pp. 204-207 (1998).
4. J-S. Lee, T.T. Igarashi, S. Fraga, E. Dahl, P. Hovgaard and T. Yasumoto, J. Appl. Phycol., 1, 147-152 (1989).
5. M.A.Quilliam, W.R. Hardstaff, N. Ishida, J.L. McLachlan, A.R. Reeves, N.W. Ross, and A.J. Windust, in: T. Yasumoto, Y. Oshima and Y. Fukuyo, eds., Harmful and Toxic Algal Blooms, IOC of UNESCO Publishers, pp. 289-292 (1996).
6. A. Gago-Martínez, J.A. Rodríguez-Vázquez, P. Thibault and M.A. Quilliam, Nat. Toxins, 4 (2), 72-79 (1996).
7. K.J. James, A.G. Bishop, B.M. Healy, C. Roden, I.R. Sherlock, M. Twohig, R. Draisci, L. Giannetti and L. Lucentini, Toxicon. 37(2): 343-357 (1999).
8. P. Vale, M.A.M.Sampayo and M. Quilliam, in: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández and T. Wyatt, eds., Harmful Algae, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers, pp. 503-506 (1998).
9. P. Masselin, P. Lassus and M. Bardouil, J. Appl. Phycol. 4: 385-389 (1992)
10. A. Morono, F. Arévalo, M.L. Fernández, J. Maneiro, Y. Pazos, C. Salgado and J. Blanco, in: Abstracts from the 3rd International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Long Island, USA, 19-23 June, p. 58 (2000)
11. J. Blanco, Y. Pazos, F. Arévalo, C. Salgado, M. Bermúdez de la Puente, J. Maneiro y A. Morono, in: Junta de Andalucía, Proceedings of the VI Iberian Workshop on Toxic Phytoplankton and Phytotoxins, Publicaciones de la Consejería de Agricultura y Pesca, pp. 127-138 (1999).
12. B. Reguera, I. Bravo, H. MacCall and M.I.Reyero, in: T. Yasumoto, O. Oshima & Y. Fukuyo, eds., Harmful and Toxic Algal Blooms, IOC of UNESCO Publishers, pp. 257-260 (1996).
13. A.D. Cembella, Occurrence of okadaic acid, a major diarrhetic shellfish toxin, in natural populations of *Dinophysis* spp from the Eastern coast of North America. J.Appl. Phycol. 1: 307-310 (1989).
14. N. Johansson, E. Granéli, T. Yasumoto, P. Carlsson and C. Legrand, in: T. Yasumoto, Y. Oshima & Y. Fukuyo, eds., Harmful and Toxic Algal Blooms, IOC of UNESCO Publishers, pp. 277-280 (1996).
15. P. Andersen, B. Hald and H. Emsholm, in: T. Yasumoto et al., Y. Oshima & Y. Fukuyo, eds., Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC of UNESCO Publishers, pp. 281-284 (1996).

ARTÍCULO 3:

Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain).

Bravo, I., Fernández, M.L., Ramilo, I. and Marínez, A. 2001. Toxicon 39, 1537-1545.

Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain).

RESUMEN

La composición de toxinas DSP de 19 cepas de *Prorocentrum lima* de diferentes localizaciones de las Rías Gallegas (Vigo y Pontevedra) fue investigada por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a detección fluorimétrica. El procedimiento de ebullición-congelación-descongelación-hidrólisis fue aplicado durante la extracción para la detección de AO, DTX1, DTX2 y sus derivados esterificados. El AO y la DTX2 fueron detectadas en forma libre y esterificada, ésta última siempre en cantidades considerablemente menores, mientras que la DTX1 estuvo siempre presente en forma libre. Este resultado sugiere que la hipótesis de que las formas esterificadas representarían un mecanismo de autoprotección para el almacenamiento de las toxinas en una forma menos activa no sería aplicable a la DTX1. Se detectó un ligero incremento en la concentración de toxina por célula durante el crecimiento, si bien la composición de toxinas no varió de manera apreciable. La producción y el perfil de toxinas variaron significativamente en función de la cepa. El análisis de cluster permitió la diferenciación de 4 grupos de *P.lima* de acuerdo con su composición de toxinas. Es de destacar que uno de los clusters comprendió todas las cepas recogidas en una localización caracterizada por su aislamiento geográfico, mientras que el resto de los clusters comprendieron cepas de distintas localizaciones. Las diferencias encontradas entre el perfil de toxinas de las diferentes cepas de *P. lima* y el correspondiente a los moluscos contaminados con toxinas DSP, junto con la muy buena correlación entre la ocurrencia de *Dinophysis* spp y la toxicidad DSP en los moluscos corroboran que estas especies planctónicas son los principales agentes responsables de los eventos tóxicos en Galicia.

Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain)

I. Bravo^{a,*}, M.L. Fernández^b, I. Ramilo^a, A. Martínez^b

^aInstituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo. Apto 1552, 86200 Vigo, Spain

^bLaboratorio de Sanidad Exterior de Vigo. European Community Reference Laboratory on Marine Biotoxins. Estación Marítima de Vigo, s/n, 36271 Vigo, Spain

Received 27 November 2000; accepted 31 March 2001

Abstract

The DSP toxin composition of 19 *Prorocentrum lima* isolates from different locations of the Galician rias (Vigo and Pontevedra) was investigated by high performance liquid chromatography coupled with fluorimetric detection. Boiling and freeze/thaw/hydrolyse methodology were applied during extraction to detect OA, DTX1, DTX2 and their esterified derivatives. OA and DTX2 were detected in both free and esterified form, the latter always in very low amounts, whilst DTX1 was always present in the free form. This indicates that the hypothesized self-protection mechanism of toxin storage in the less active esterified forms does not seem to apply to DTX1. A slight increase in the toxin concentration per cell was found during growth, although toxin composition did not vary appreciably. Toxin production and toxin profile varied significantly depending on the isolate. Four groups of *P. lima* were differentiated by cluster analysis according to their toxin composition. It is noteworthy that one of the clusters comprised all the strains collected from one location characterised by its geographical isolation, whereas the other clusters consisted of isolates from different locations. The differences in the toxin profile from *P. lima* strains and from the DSP contaminated shellfish, together with the very good correlation between *Dinophysis* spp occurrence and DSP toxicity in shellfish, support that these planktonic species are the main agents responsible for DSP events in Galicia. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Prorocentrum lima*; Diarrhetic shellfish poisoning; DSP toxins; Toxic dinoflagellates; Galician rias

1. Introduction

Prorocentrum lima (Ehrenberg) Dodge is a benthic dinoflagellate usually found attached or associated to macrophytes, floating detritus, debris or other substrates and less commonly found in plankton. Although this is a ubiquitous species, it appears to be most abundant in tropical and subtropical waters. Together with other benthic species associated with coral reefs, such as *G. toxicus*, *P. concavum*, and *O. tamarensis*, it has been linked to the toxic syndrome known as Ciguatera (Yasumoto et al., 1980; Bomber et al., 1988). The severity of this complex syndrome has led to a number of studies in the epiphytic environment of tropical and subtropical areas, whereas little is known on benthic

dinoflagellates in general and *P. lima* in particular from temperate waters.

P. lima and *Dinophysis* spp are known to produce a suite of polyether metabolites, some of which, when present in shellfish, are the cause of diarrhetic shellfish poisoning (DSP), a severe gastrointestinal disease. The implication of *P. lima* in DSP episodes is questioned because its benthic character makes its uptake by bivalve molluscs very unlikely. The attachment of *P. lima* to different macroalgae fouling mussel rafts from the Galician rias (NW Spain) has been reported by Bravo (1991) in concentrations of up to 2255 cells/g fresh weight of *Ulva* spp. However, DSP events in these production areas have always been associated with the presence of *Dinophysis* species in plankton (Reguera et al., 1993; Blanco et al., 1999). DSP toxins present in shellfish from other European countries and Japan, New Zealand,

* Corresponding author.

Singapore, Chile, South Africa and Australia, have also been linked to *Dinophysis* blooms (Dahl and Yndestad, 1985; Kat, 1985; Lassus et al., 1985; Kumagai et al., 1986; Hallegraeff, 1987; MacKenzie, 1991; Lembeye et al., 1993; Pitcher et al., 1993; Tubaro et al., 1995; Carmody et al., 1996; Suzuki et al., 1997; Holmes et al., 1999). However, not all the DSP incidents clearly correlate with *Dinophysis* blooms, as in the case of the coasts of Nova Scotia (Marr et al., 1992; Lawrence et al., 1998), where *P. lima* cells found primarily within the filaments of the phaeophyte, *Pilayella littoralis*, have been put forward as the most likely source of DSP toxicity (Lawrence et al., 1998).

Due to the great difficulties in obtaining pure laboratory cultures of *Dinophysis* spp, *P. lima* cultures have been widely used to study the kinetics of DSP toxin production, since Murakami et al. (1982) identified okadaic acid as one of the basic components produced by this epiphytic species. *P. lima* has also been shown to be a reliable source of okadaic acid (OA) and dinophysitoxin-1 (DTX1) to produce toxin standards and reference material.

OA and its methyl homologue, DTX1 were for many years thought to be the major toxins produced by *P. lima* species (Lee et al., 1989). Dinophysitoxin-2 (DTX2), an isomer of OA first isolated from Irish mussels (Hu et al., 1992), has also been found in *P. lima* cultures, but only in trace amounts. OA, DTX1 and DTX2 are powerful inhibitors of protein phosphatases-1 and -2A and potent tumour-promoting agents in vitro. A number of esters of OA were described by Yasumoto et al. (1989) and two diol esters of OA were isolated and identified on the basis of spectroscopic methods in *P. lima* strains from Vigo (Norte et al., 1994). Pharmacological experiments showed that diol esters are as active as the free acid, although the period of latency is significantly higher for the esters.

The development and implementation of liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) and LC–MS/MS techniques has been crucial in improving the knowledge of DSP toxin production, and additional derivatives such as new diol esters by *P. lima* (Hu and Marr, 1992). The water soluble dinophysitoxin-4 (DTX4), a tri-sulphate ester derivative of OA (Hu et al., 1995b), has been isolated and identified. Moreover, two new sulphated water soluble DSP toxin derivatives, DTX5a and DTX5b were found in cultures of *Prorocentrum maculosum* (Hu et al., 1995a).

Nevertheless, although LC–MS equipment has become less expensive in the last few years, it is not available in most laboratories involved in marine biotoxin monitoring and research. High performance liquid chromatography coupled with fluorimetric detection (HPLC–FD) techniques are still valuable tools in the study of DSP toxin production, in spite of their limitations.

HPLC–FD techniques permit the detection of those DSP toxins which possess a free carboxylic group in the molecule (OA, DTX1, DTX2). Lee's method (Lee et al., 1987) involving the use of 9-anthryldiazomethane (ADAM) as fluorophore, is the most widely used method for detection of OA

and its homologues in microalgae and shellfish. Detection of esterified DSP toxins such as diol esters or DTX4 by this method requires previous chemical or enzymatic hydrolysis. Quilliam et al. (1996) have shown that a rapid enzymatically-catalysed hydrolysis of DTX4 to the diol esters, which are more slowly hydrolysed to OA, occurs when cells are broken during simple extractions with aqueous methanol, leading to erratic results in the determination of toxin concentrations. To determine OA, DTX1 and DTX2, a boiling procedure that restricts enzymatic hydrolysis has been developed by the aforementioned authors. They have also proposed a freeze/thaw/hydrolyse extraction method which promotes the conversion of the esterified toxins to OA, DTX1 or DTX2 and permits the assessment of the contribution of these derivatives to total DSP toxicity.

In the present study both the boiling and the freeze/thaw/hydrolyse extraction method have been used to investigate the toxin composition of 19 *P. lima* isolates collected from the Galician rias (Pontevedra and Vigo). The authors also discuss the significance of this benthic species in DSP contamination of shellfish.

2. Material and methods

2.1. *P. lima* strains, isolation and culture conditions

P. lima strains were isolated from macroalgae samples collected at different locations in the rias of Vigo and Pontevedra, NW Iberian Peninsula (Fig. 1). Table 1 shows the *P. lima* strains used in the experiment as well as dates of isolation, type of substrate and location. All the sampling stations (beaches and mussel rafts) are located inside the rias with the exception of the lagoon of the Cies Islands which connects with the open sea [Fig. 1(b)]. Macroalgae from beaches and mussel rafts were attached to rocks and ropes respectively. The substrate collected in the lagoon of the Cies Islands was clearly different, being a filamentous algae located in a sandy environment.

Macroalgae were thoroughly shaken with seawater from the same site to dislodge epiphytic microalgae, which were separated through 150 and 20 μm sieves. *P. lima* cells were isolated from the material collected in the 20 μm sieve after washing with 0.2 μm -filtered seawater and placed in F/2 (strains isolated before 1988) or K medium (Keller and Guillard, 1985). Strains were kept in F/2 (before 1988) or K medium until the experiment and in the same light and temperature conditions as those described below.

Cultures of *P. lima* were grown in plastic bags with 1 L of K medium at $19 \pm 1^\circ\text{C}$ on a 14:10 h light:dark cycle at a photon flux density of $60\text{--}70 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Duplicate 10–20 mL aliquots of culture were harvested for toxin analyses on the 27th day of culture for all strains. For the growth experiment, PL2V, PL6V, PL11V and PL27V strains were used, and samples were also collected on the 13th and 41st day of culture. A cell count was also carried out for each

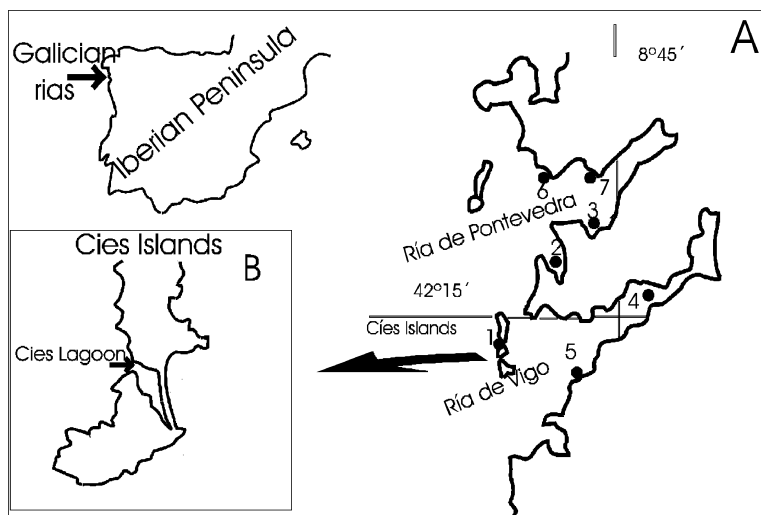


Fig. 1. (a) Position of the sampling area and locations (beaches, mussel rafts and lagoon of Cíes Islands) where samples are collected. (b) Detail of the lagoon of Cíes Island.

sampling. Culture bags had to be well shaken before sampling.

2.2. Toxin extraction

P. lima samples were extracted following the procedure developed by Quilliam et al. (1996). Each culture sample was divided in two equal portions that were subsequently filtered by 1 μ m membrane filters. One of the filters was re-suspended in 0.5 mL of Tris–HCl buffer and the tube

immersed in boiling water for 3 min in order to destroy the enzymes of *P. lima* cells and prevent hydrolysis of conjugated forms of OA, DTX1 or DTX2 which might be present. Two mL of methanol was then added and the cells were sonicated for 1 min. After centrifuging for 10 min, the supernatant was taken and the filter washed twice with 1 mL of methanol. Supernatants were combined and kept at -20°C . The second filter was re-suspended in 0.5 mL of Tris–HCl buffer and immersed in liquid nitrogen. The sample was then allowed to thaw at room temperature and

Table 1

P. lima strains used in the present study, date of collection, sample location and substrate. Also shown is the classification group to which each strain was assigned by cluster analysis for toxin composition.

Strain	Date	Sample location	Substrate	Cluster
PL2V	September 1985	Cíes Lagoon, location 1	Sandy/algae	1
PL16V	September 1996	Cíes Lagoon, location 1	Sandy/algae	1
PL17V	September 1996	Cíes Lagoon, location 1	Sandy/algae	1
PL20V	September 1996	Cíes Lagoon, location 1	Sandy/algae	1
PL24V	September 1996	Cíes Lagoon, location 1	Sandy/algae	1
PL3V	October 1985	Raft in Aldán, location 2	Algae	2
PL7V	September 1990	Raft in Bueu, location 3	Algae	2
PL4V	October 1985	Raft in Aldán, location 2	Algae	3
PL9V	September 1990	Raft in Bueu, location 3	Algae	3
PL5V	October 1985	Raft in Vigo, location 4	Algae	4
PL11V	September 1996	Canido beach, location 5	Algae	4
PL12V	September 1996	Canido beach, location 5	Algae	4
PL13V	September 1996	Canido beach, location 5	Algae	4
PL14V	September 1996	Canido beach, location 5	Algae	4
PL6V	September 1990	Raft in Bueu, location 3	Algae	4
PL26V	October 1997	Areas beach, location 7	Algae	4
PL27V	October 1997	Canelas beach, location 6	Algae	4
PL29V	October 1997	Canelas beach, location 6	Algae	4
PL28V	October 1997	Canelas beach, location 6	Algae	4

Table 2

Toxin concentrations (pg/cell) of *P. lima* strains isolated from Galician coast

Strain	Cluster	OA		OA ester		DTX1		DTX2		DTX2 ester	
		Mean (<i>n</i> = 2)	Std	Mean (<i>n</i> = 2)	Std	Mean (<i>n</i> = 2)	Std	Mean (<i>n</i> = 2)	Std	Mean (<i>n</i> = 2)	Std
PL2V	1	8.75	0.09	8.11	0.09	3.02	0.30	0	0	0	0
PL16V	1	12.87	0.36	9.44	1.52	4.60	0.19	0.97	0.12	0.70	0.33
PL17V	1	9.70	0.44	7.24	1.18	3.30	0.32	0.49	0.05	0.60	0.16
PL20V	1	8.37	0.72	8.78	0.47	1.84	0.57	1.14	0.30	1.60	0.20
PL24V	1	6.65	0.62	6.75	1.54	2.73	0.77	0.36	0	0.52	0.02
PL3V	2	1.86	0.55	8.96	0.67	3.05	0.98	0.10	0.14	0.68	0
PL7V	2	4.26	1.68	17.51	8.82	0	0	0.17	0.24	1.33	0.24
PL4V	3	2.40		2.88		11.62		0.33		0.51	
PL9V	3	3.62	0.23	1.94	0.79	12.45	2.19	0	0	0	0
PL5V	4	1.53	0.22	1.92	0.16	3.21	0.91	0	0	0.26	0.06
PL11V	4	3.34	0.48	4.91	0.30	7.63	0.58	0.06	0.08	0	0
PL12V	4	5.11	0.83	7.02	0.53	12.39	2.56	0.35	0.30	1.02	0.11
PL13V	4	5.36	0.40	4.65	1.27	11.88	0.36	0.65	0.06	0.20	0.29
PL14V	4	5.69	0.77	6.34	1.67	11.57	2.44	0.19	0.27	0.53	0.03
PL6V	4	0.19	0.07	0.77	0.05	1.01	0.39	0	0	0	0
PL26V	4	2.61	0.06	5.85	0.36	4.13	0.22	0.22	0.11	0.80	0.07
PL27V	4	3.10	0.88	8.82	1.12	8.26	1.10	0	0	0.99	0.42
PL28V	4	1.73	0.16	3.00	0.15	2.70	0.61	0	0	0.55	0.17
PL29V	4	3.10	0.66	3.25	1.67	4.51	0.55	0.49	0.07	0.04	0.05

left in the dark overnight, allowing the enzymatic hydrolysis of conjugated forms of OA, DTX1 and DTX2. Two mL of methanol was then added and the sample was sonicated and extracted as in the first filter. After the addition of 'n/2' mL of water to each 'n' mL aliquot of the previous extracts, a double extraction with chloroform (1.5n mL) followed.

2.3. Toxin analysis

Derivatization, clean-up and HPLC–FD detection were carried out following Lee et al.'s procedure (1987) with slight modifications. Derivatization was performed with ADAM reagent (SERVA). Characteristics of the system were: Hewlett-Packard 1050, Merck Superspher 100-RP18 (4 mi, 250 × 4 mm); mobile phase MeCN:H₂O (80:20, 1.1 mL min⁻¹ flow); column temperature 35°C; fluorescence detector HP 1046 A with excitation and emission waves of 365 and 412 nm, respectively. Standards used were OA (NRC, Canada), DTX1 from Calbiochem and DTX2 kindly provided by K. James (Cork, Ireland).

3. Results

OA and DTX1 were found in all the strains with the exception of PL7V, in which DTX1 was not found in detectable amounts. Data on toxin composition is shown in Table 2.

For the carboxylic toxins, the highest values were 12.9 pg OA/cell (PL16V), and 12.4 pg DTX1/cell (PL12V). DTX2 was detected in considerably lower amounts in 13 strains,

1.14 pg/cell being the maximum value. The application of the two extraction procedures with and without enzymatic hydrolysis revealed the presence of esterified OA and DTX2 (Fig. 2 and Table 2) in most *P. lima* strains. Esterified DTX1 was not detected in any of the strains. Esterified OA reached values as high as 17.5 pg/cell (PL7V) expressed as pg of equivalents of free OA. Esters of DTX2 were found in 15 strains, reaching values of 1.6 pg/cell expressed as pg of equivalents of free DTX2. Toxin composition clearly varied depending on the strain as well as total toxin production which ranged from 2 pg/cell for PL6V, and 28.6 pg/cell for PL16V. In addition to the peaks with retention times coinciding with those of OA, DTX1 and DTX2, a number of small neighbouring peaks were found. Some of these peaks increase in the area after enzymatic hydrolysis, indicating the possibility of other OA analogues existing in both carboxylic and esterified form.

The dendrogram shown in Fig. 3 is the result of cluster analysis (using squared euclidian distance) performed using the percentages of all the components found in the 19 strains. Strains were placed in four groups depending on their toxin composition, as shown in Fig. 4. The most clearly differentiated group is the one separated first, corresponding to cluster 1, which includes the strains PL2V, PL16V, PL17V, PL20V and PL24V.

Table 1 indicates the assignment of each strain to its corresponding group together with the origin of each. The strains included in cluster 1 were all isolated from the lagoon of the Cíes Islands. One-way ANOVA showed significant differences ($P < 0.01$) among the toxic profile of the four groups

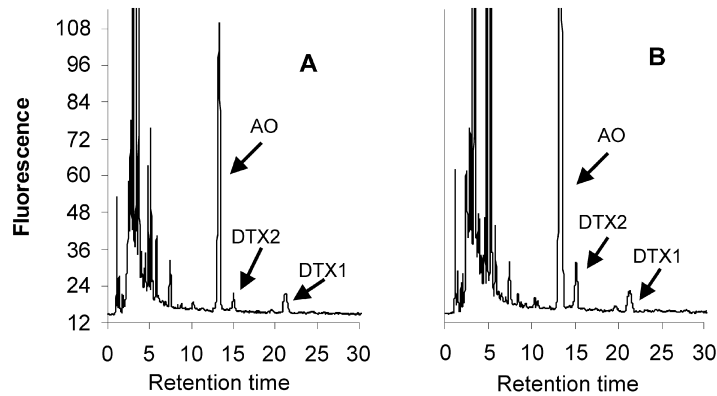


Fig. 2. HPLC–FD chromatograms of DSP toxins from the same *Prorocentrum lima* culture sample (PL20V) using boiling (a) and freeze/thaw/hydrolyse (b) extraction.

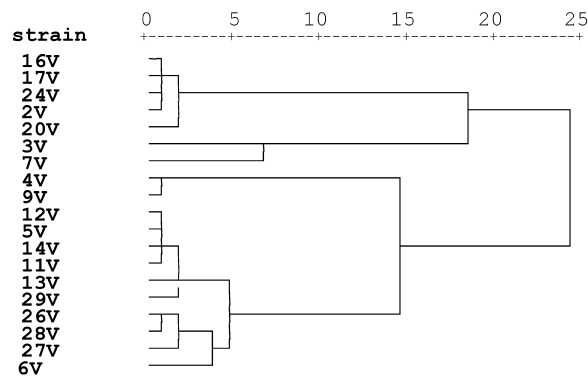


Fig. 3. Dendrogram for the 19 strains of *P. lima* isolated from Galician coast based on toxin composition (percentage of OA, DTX1, OA ester, DTX2 and DTX2 ester).

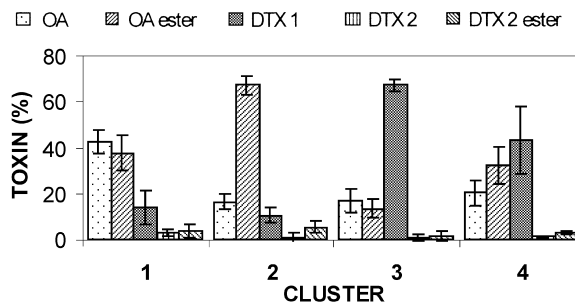


Fig. 4. Toxin composition of the four groups formed from cluster classification of 19 *P. lima* strains isolated from different locations in the Galician coast. Error bars = standard deviation.

for at least two of the main toxins. For clusters 1 and 3 the intracellular proportion of OA in free form was quite similar to that in esterified form, and the same can be said for DTX2 and esterified DTX2. DTX1 was clearly the dominant toxin in group 3, while esterified OA was the dominant toxin in group 2. No significant differences were observed in the content of the three main toxins for cluster 4.

For the strains for which cell counts were carried out at three points on the growth curve, rates of 0.06, 0.08, 0.13, 0.14 div/day were obtained for PL11V, PL27V, PL2V and PL6V, respectively, for the first period of the curve (13–27 days of culture, Fig. 5). Growth rates decrease to less than 0.05 div/day between days 27 and 41. These data mean that PL27V and PL11V required more than ten days for

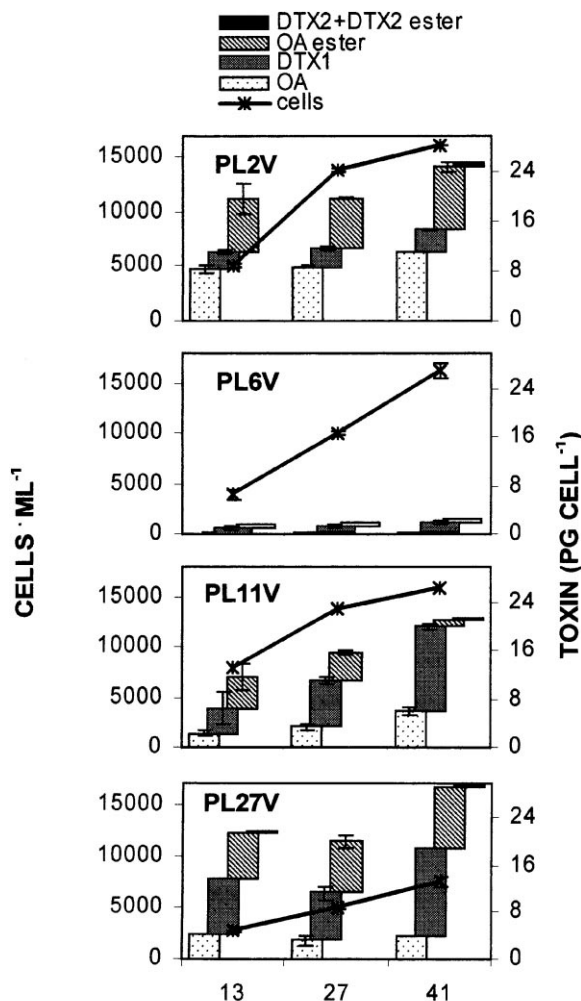


Fig. 5. Toxin composition of four strains during three different growth stages of culture.

duplication, even during exponential growth. Fig. 5 shows growth in the four strains throughout the experiment. The differences and similarities in growth between strains did not correspond to equivalent differences and similarities in toxin production.

Toxin composition did not vary appreciably during the growth of the strains PL2V, PL6V and PL27V in the 41 days of culture. Strain PL11V experienced an increase in the concentration of DTX1 and a considerable decrease in esterified OA during the period from day 27 to day 41 (Fig. 5). With the exception of esterified OA of PL11V, the remaining strains showed an increase in the concentration per cell in all components during growth. DTX2 and its esterified forms, when present, occurred in very low concentrations and were more evident on the last day of sampling (Fig. 5), when a slight increase in these toxins during growth lead to the detection limit being surpassed.

4. Discussion

P. lima has been known to be present on the coasts of Galicia since 1985, when cultures of this species were made from samples of algae from the lagoon of the Cíes Island and from rafts in the rías of Pontevedra and Vigo (Bravo et al., 1997). This paper provides a comparative study of the toxin profiles of all strains isolated from samples collected in this region from 1985 to the present, which have been kept in the collection of toxic phytoplankton cultures of the Oceanographic Center in Vigo. Results of the toxin analysis of some of these strains have already been cited by Lee et al. (1989), who reported variations in OA and DTX1 quantities from five clones of *P. lima* isolated from the Galician coast (OA varied from 5 to 24.5 pg/cell and DTX1 from 6 to 14.3 pg/cell). Sechet et al. (1998) also report the toxin profile of PL4V, one of the strains considered in this

paper. Coinciding with the data presented here, these authors report DTX1 as the major toxin component in their cultures. In addition, using the boiling and freeze/thaw methods of extraction for quantitative analysis by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), they were able to detect an oxidized derivative of OA in the strain from the ría of Vigo and a very complex mixture of DTX4-related compounds, which were probably detected as esterified OA in our HPLC-FD analyses. The freeze/thaw/hydrolyse method, which promotes the conversion of the esterified toxins to OA, DTX1 or DTX2, while not discriminating between diol-esters and DTX4-type compounds, permits the assessment of the contribution of these derivatives to total DSP toxicity. The application of this procedure is clearly indicated when assessing toxic potential of dinoflagellate samples, especially when taking into account the important contribution of esterified derivatives to total toxicity. This should also be extended to the analysis of the toxicity of *Dinophysis* samples, as shown by Morono et al. (in preparation).

OA, DTX1 and DTX2 are strong inhibitors of protein phosphatases PP1 and PP2A (Haystead et al., 1989) and it has been suggested that they have an allelopathic effect on other microalgal growth (Windust et al., 1996). Hu et al. (1995a) have suggested that intracellular storage of the toxins as the less active sulphates could be an effective self-protection mechanism for the DSP-producing cells and even a means of excreting the acidic toxins from the cell to the aqueous medium. However, from the results obtained in this study, there does not seem to be a clear pattern of storage of DSP toxins inside the cells, although for some of the strains esterified forms were clearly dominant (cluster 2); for other strains, the acidic form (e.g. DTX1 in cluster 3) was present in considerably greater amounts. This hypothetical self-protection mechanism does not seem to be applicable in the case of DTX1 which, although reported to be more slightly toxic than OA, has not been clearly detected in esterified form in significant amounts in our experiment.

Few studies have reported on variability in toxin production of different *P. lima* strains. Morton and Tindall (1995) describe a significant difference in biochemical features between 17 clones from three separate sites of Herbon Island (Great Barrier Reef of Australia). Based on the differences detected in reproduction rates, pigments, toxins (OA and DTX1) and macromolecular compounds (total protein, lipid and carbohydrate), these authors suggest the existence of two genetically different populations in this area. From the results of the present paper, the differentiation observed in the cluster analysis of the strains corresponding to the region of the lagoon of the Cies Islands must be emphasised. All the strains from this area were separated into a distinct group according to their toxin compositions (cluster 1 in Fig. 4), whereas the other groups were not separated by defined locations (Table 1). It must be mentioned that the lagoon of

the Cies Islands is characterised by its geographical isolation relative to the ria of Vigo and Pontevedra, since its connection with the outside is orientated towards the open sea [Fig. 1(b)], which would support the hypothesis of an isolation of the population in this area.

In relation to toxin production during growth, Fig. 5 illustrates a progressive increase in total toxicity per cell. Maximum toxin concentrations in the stationary phase of *P. lima* cultures has also been cited in cultures of this species coming from other regions (MacLachlan et al., 1994; Quilliam et al., 1996; Sechet et al., 1998). Also, in our experiment an increase in all toxin components was detected during growth with the exception of the esterified components of OA of the strain PL11V, which fell significantly throughout the culture period. The possible excretion of some component into the medium was not considered in our experiment, although this does not seem likely to be the cause, since Quilliam et al. (1996) describe the accumulation of OA and DTX1 in the medium, but only at trace levels of DTX4 and OA diol ester.

As for the growth rates of *P. lima* cultures described in the present study, the low values of divisions/day must be stressed. Previous results from the cultures of some strains used in this study cite maximum values of up to 0.40 ± 0.09 div/day in 250 μ L of K medium in tissue culture plate (Bravo et al., 1997). However, these authors obtain maximum values of 0.15 div/day in Erlenmeyers with 150 mL of the same medium, ascribing it to the progressive mortality occurring when the cells detach from the culture flasks. On using plastic bags to which cells do not adhere to such an extent, this inconvenience was avoided in our experiment, but higher growth rates were not obtained. An effect not evaluated in the *P. lima* growth experiment in bags was that the plastic may bring about the transmission of light radiation to the cultures. A reduced light intensity or a change in the light spectrum may have led to a fall in the rates of cell division. Even if this were the case, it would not explain the differences found in the growth of the four strains used for this experiment. On the other hand, the differences in growth rates do not seem to be related to differences in toxin composition nor to total toxin content, since the groups of strains differentiated by growth do not correspond to those differentiated by toxin composition in the cluster analysis. From the data described by Morton et al. (1995), differences in growth rates of the strains supposedly belonging to the same population group can also be deduced.

The presence of *P. lima* on the rafts where all Galician mussel production takes place, and its known capacity to produce diarrhetic toxins, led to the association of this species, at first, with the appearance of DSP toxins in shellfish from the Galician rias (Marr et al., 1992). Nevertheless, there is now enough knowledge of toxins produced by species of the genus *Dinophysis* present in the area, together with the good correlation between the occurrence of these species and DSP incidents, to clearly indicate that *Dinophysis* spp is the causative agent of DSP episodes

detected in the region. In addition, the main toxins found in mussels from Galician rias in the last few years are OA, DTX2 and DTX3, the latter in low quantities, while DTX1, which is present in most *P. lima* strains, has never been found in shellfish from this region at significant levels (Fernandez et al., 1996, 1998). Therefore, regarding the causative species, it seems that the DSP events from Galicia are not similar to those of eastern Canada, where *P. lima* is strongly suspected of producing the DSP toxins found in mussels (Jackson et al., 1993; Lawrence et al., 1998). Unlike the case of Galician mussels, DTX1 is the major toxin component in DSP-contaminated shellfish in Nova Scotia, Canada (Quilliam et al., 1993), a fact which fits in well with the toxin profile detected by LC–MS analysis of epiphytic microalgal material collected from a mussel culture site with *P. lima* as the only dinoflagellate present in the sample (Lawrence et al., 2000). Morton et al. (1999) have also identified the presence of DTX1 in epiphytic samples rich in *P. lima* from Maine (United States), although these authors did not detect OA or DTX1 by LC–MS/MS in the shellfish from these sampling sites, but only low levels of OA-like activity by protein phosphatase inhibition assay.

In the same way as has been documented on the Atlantic coast of Canada (Lawrence et al., 2000), the mussel rafts of the Galician rias provide a habitat which favours the colonisation and growth of macroalgae which support the micro-organism communities among which epiphytes such as *P. lima* are found. Bravo (1991) mentions maximum values of 2255 *P. lima* cells/g fresh weight on *Ulva* spp and 1600 cells/g fresh weight on *Enteromorpha* sp + *Giffordia* sp from a mussel raft on 9 September 1987, quantities which may be similar to the maximum concentrations of *P. lima* cited by Lawrence et al. (2000) (15,000 cells/g dry weight) in Nova Scotia. From the study by Bravo (1991) it is deduced that *P. lima* populations on the rafts of the Galician rias are governed by a seasonality and a specificity of substrate which make them very limited both in time and location. For this reason, while the ability of these populations to detach from the substrate and enter the mussel through the trophic chain is unknown, it cannot be dismissed that this may occur on a lesser scale than that used in the detection of toxic phytoplankton on the Galician coast.

Acknowledgements

We thank Amelia Fernandez-Villamarín for her technical assistance and the crew of B/O José M. Navaz for collecting samples. Thanks also are extended to J. James for a sample of DTX2. This research was supported by projects MAR95-1849 and PGIDT99MAR40201.

References

- Blanco, J., Fernandez, M.L., Miguez, A., Morono, A., 1999. Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: One- and two-compartment models and the effect of environmental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 176, 153–163.
- Bomber, J.W., Morton, S.L., Babinchack, J.A., Norris, D.R., Morton, J.G., 1988. Epiphytic dinoflagellates of drift algae—another toxigenic community in the ciguatera food chain. *Bull. Mar. Sci.* 43, 204–214.
- Bravo, I., 1991. Results of preliminary studies in the field and in culture of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. *Revue Internationale d’Oceanographie Medicale* 101–104, 189–196.
- Bravo, I., Ramilo, I., Franco, J.M., Marono, E., Fraga, S., 1997. Coleccion de cultivos de microalgas nocivas del Centro Oceanografico de Vigo. Resultados experimentales de algunas especies. *Inf. Tec. Inst. Esp. Oceanogr.* 168, 32 pp.
- Carmody, E.P., James, K.J., Kelly, S.S., 1996. Dinophysitoxin-2: The predominant diarrhetic shellfish toxin in Ireland. *Toxicon* 34 (3), 351–359.
- Dahl, E., Yndestad, M., 1985. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in Norway in the autumn 1984 related to the occurrence of *Dinophysis* spp. In: Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G. (Eds.). *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, New York, pp. 495–500.
- Fernandez, M.L., Miguez, A., Cacho, E., Martinez, A., 1996. Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of spanish mussels. *Toxicon* 34 (3), 381–387.
- Fernandez, M.L., Miguez, A., Morono, A., Cacho, E., Martinez, A., Blanco, J., 1998. Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T. (Eds.). *Harmful Microalgae*. Xunta de Galicia and UNESCO, Santiago de Compostela, Spain, pp. 449–452.
- Hallegraeff, G.M., 1987. Red tides in the Australasian region. *Rep. CSIRO Mar. Lab. Hobart*, 187, 20 pp.
- Haystead, T.A.J., Sim, A.T.R., Carling, D., Honnor, R.C., Tsukitani, Y., Cohen, P., Hardie, D.G., 1989. Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* 337, 78–81.
- Holmes, M.J., Teo, S.L.M., Lee, F.C., Khoo, H.W., 1999. Persistent low concentrations of diarrhetic shellfish toxins in green mussels *Perna viridis* from the Johor Strait, Singapore: First record of diarrhetic shellfish toxins from South-East Asia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 181, 257–268.
- Hu, T., Marr, J., 1992. New diol esters isolated from cultures of the dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*. *Journal of Natural Products* 55 (11), 1631–1637.
- Hu, T., Doyle, J., Jackson, D., Marr, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 1992. Isolation of a new Diarrhetic Shellfish Poison from Irish mussels. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 39–41.
- Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., MacLachlan, J.L., Wright, J.L.C., 1995. Two new water-soluble DSP toxin derivatives from the Dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: Possible storage and excretion products. *Tetrahedron Letters* 36 (51), 9273–9276.
- Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., Wright, L.C., 1995. Identification of DTX-4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 597–599.
- Jackson, A.E., Marr, J.C., McLachlan, J.L., 1993. The production of Diarrhetic Shellfish Toxins by an isolate of *Prorocentrum lima* from Nova Scotia, Canada. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.).

- Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, New York, pp. 513–518.
- Kat, M., 1985. *Dinophysis acuminata* blooms, the distinct cause of Dutch mussel poisoning. In: Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G. (Eds.). Toxic Dinoflagellates. Elsevier, New York, pp. 73–77.
- Keller, M.D., Guillard, R.R.L., 1985. Factors significant to marine dinoflagellate culture. In: Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G. (Eds.). Toxic Dinoflagellates. Elsevier, New York, pp. 113–116.
- Kumagai, M., Yanagi, T., Murata, M., Yasumoto, T., Kat, M., Lassus, P., Rodriguez-Vazquez, J.A., 1986. Okadaic acid as the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning in Europe. Agric. Biol. Chem. 50 (11), 2853–2857.
- Lassus, P., Bardouil, M., Truquet, I., Truquet, P., Le Baut, C., Pierre, M., 1985. *Dinophysis acuminata* distribution and toxicity along the southern Brittany coast (France): Correlation with hydrological parameters. In: Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G. (Eds.). Toxic Dinoflagellates. Elsevier, New York, pp. 159–164.
- Lawrence, J.E., Bauder, A.G., Quilliam, M.A., Cembella, A.D., 1998. *Prorocentrum lima*: A putative link to diarrhetic shellfish poisoning in Nova Scotia, Canada. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T. (Eds.). Harmful Microalgae. Xunta de Galicia and UNESCO, Santiago de Compostela, Spain, pp. 78–79.
- Lawrence, J.E., Grant, J., Quilliam, M.A., Bauder, A.G., Cembella, A.D., 2000. Colonization and growth of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and associated fouling macroalgae on mussels in suspended culture. Mar. Ecol. Progr. Ser. 201, 147–154.
- Lee, J-S., Yanagi, T., Kenna, R., Yasumoto, T., 1987. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. Agric. Biol. Chem. 51, 877–881.
- Lee, J-S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., Yasumoto, T., 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellates species. J. Appl. Phycol. 1, 147–152.
- Lembeye, G., Yasumoto, T., Zhao, J., Fernandez, R., 1993. DSP outbreak in Chilean fiords. In: Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G. (Eds.). Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 525–530.
- MacKenzie, L., 1991. Toxic and noxious phytoplankton in Big Glory Bay, Stewart Island, New Zealand. J. Appl. Phycol. 3 (1), 19–34.
- MacLachlan, J.L., Marr, J.C., Colon-Kelly, A., Adamson, A., 1994. Effect of nitrogen concentrations and cold temperatures on DSP-toxin concentrations in the dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Prorocentrales, Dinophyceae). Natural Toxins 2 (5), 263–270.
- Marr, J.C., Jackson, A.E., McLachlan, J.L., 1992. Occurrence of *Prorocentrum lima*, a DSP toxin-producing species from the Atlantic coast of Canada. J. Appl. Phycol. 4, 17–24.
- Morton, S.L., Tindall, D.R., 1995. Morphological and biochemical variability of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from three locations at Heron Island, Australia. J. Phycol. 31, 914–921.
- Morton, S.L., Leighfield, T.A., Haynes, B.L., Petitpain, D.L., Busman, M.A., Moeller, P.D.R., Bean, L., McGowan, J., Hurst, J.W., Van Dolah, J.R., F. M., 1999. Evidence of Diarrhetic Shellfish Poisoning along the coast of Maine. J. Shell. Res. 18 (2), 681–686.
- Murakami, Y., Oshima, Y., Yasumoto, T., 1982. Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 48, 69–72.
- Norte, M., Padilla, A., Fernandez, J.J., Souto, M.L., 1994. Structural determination and biosynthetic origin of two ester derivatives of okadaic acid isolated from *Prorocentrum lima*. Tetrahedron 50 (30), 9175–9180.
- Pitcher, G.C., Horstman, D.A., Calder, D., De Bruyn, J.H., Post, B.J., 1993. The first record of diarrhetic shellfish poisoning on the South African coast. S. Afr. J. Sci. 89 (10), 512–514.
- Quilliam, M.A., Gilgan, M.W., Pleasance, S., Defreitas, A.S.W., Douglas, D., Fritz, L., Hu, T., Marr, J.C., Smyth, C., Wright, J.L.C., 1993. Confirmation of an incident of Diarrhetic Shellfish Poisoning in eastern Canada. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.). Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, New York, pp. 547–552.
- Quilliam, M.A., Hardstaff, W.R., Ishida, N., McLachlan, J.L., Reeves, A.R., Rose, N.W., Windust, A.J., 1996. Production of Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.). Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC of UNESCO, Sendai, pp. 289–292.
- Reguera, B., Mariño, J., Campos, M.J., Bravo, I., Fraga, S., Carbonell, A., 1993. Trends in the occurrence of *Dinophysis* spp. in Galician waters. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.). Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, New York, pp. 559–564.
- Sechet, V., Quilliam, M.A., Rocher, G., 1998. Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) toxins in *Prorocentrum lima* in axenic and non-axenic batch culture: detection of new compounds and kinetics of production. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T. (Eds.). Harmful Microalgae. Xunta de Galicia and UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 485–488.
- Suzuki, T., Mitsuya, T., Imai, M., Yamasaki, M., 1997. DSP toxin contents in *Dinophysis fortii* and scallops collected at Mutsu Bay, Japan. J. Appl. Phycol. 8 (6), 509–515.
- Tubaro, A., Sosa, S., Bussani, D., Sidari, L., Honsell, G., Della Loggia, R., 1995. Diarrhetic toxicity induction in mussels of the Gulf of Trieste. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., Marcaillou-Le Baut, C. (Eds.). Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, Paris, pp. 249–254.
- Windust, A.J., Wright, J.L.C., McLachlan, J.L., 1996. The effects of the diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid and dinophysistoxin-1, on the growth of microalgae. Marine Biology 126, 19–25.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Murakami, Y., Nakajima, I., Bagnis, R., Fukuyo, Y., 1980. Toxicity of benthic dinoflagellates found in coral reef. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 46 (3), 327–331.
- Yasumoto, T., Murata, T., Lee, J.S., Torigoe, K., 1989. Polyether toxins produced by dinoflagellates. In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. (Eds.). Mycotoxins and Phycotoxins. Elsevier, Amsterdam, pp. 375–382.

ARTÍCULO 4:

First report of PTX-2 in phytoplankton net hauls and mussels from the Galician Rías Bajas during proliferations of *Dinophysis acuta* and *D. caudata*.

Fernández, M.L., Míguez, A., Martínez, A., Morono, A., Arévalo, F., Pazos, Y., Salgado, C., Correa, J., Blanco, J., González-Gil, S. and Reguera, B. In: Villalba, A., Reguera B., Romalde, J., Beiras, R. (eds), Consellería de Pesca y Asuntos Marítimos, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of Unesco. 2003. pp 75-83.

**First report of PTX-2 in phytoplankton net hauls and mussels
from the Galician Rías Bajas during proliferations
of *Dinophysis acuta* and *D. caudata*.**

RESUMEN

Dinophysis acuta, en coincidencia con pequeñas cantidades de *D. caudata* y *D. rotundata* pueden constituir un componente importante dentro de las especies de *Dinophysis* reponsables de los episodios tóxicos de DSP en otoño (septiembre-octubre) en las Rías Bajas Gallegas. Análisis previos de mejillones, arrastres fitoplanctónicos y células de *Dinophysis* por HPLC-FD habían mostrado que AO y DTX2 eran las principales toxinas diarreicas asociadas con los eventos DSP. Sin embargo, datos de años recientes mostraron que además de *D. fortii*, otras especies de *Dinophysis* podían ser el origen de las pectenotoxinas encontradas en bivalvos de origen asiático o europeo. La presencia de pectenotoxinas fue explorada aplicando técnicas de HPLC-MS en mejillones y en arrastres fitoplanctónicos de las Rías de Vigo y Pontevedra, recogidas en diferentes estaciones y cuando las poblaciones fitoplanctónicas estaban dominadas por diferentes especies de *Dinophysis* spp. Nuestros resultados muestran que i) PTX2 y PTX2-SA estuvieron presentes en mejillones y en los arrastres fitoplanctónicos cuando las concentraciones de *D. acuta* y *D. caudata* se incrementaron y ii) las pectenotoxinas pueden ser las toxinas predominantes dentro del complejo de toxinas lipofílicas en el plancton y en los mejillones de las Rías Bajas Gallegas durante las proliferaciones de *D. acuta* y *D. caudata* de otoño. Esta es la primera documentación de PTX2 y PTX2-SA en fitoplancton y mejillones de Galicia.

First report of Pectenotoxin-2 in phytoplankton net-hauls and mussels from the Galician Rías Baixas (NW Spain) during proliferations of *Dinophysis acuta* and *Dinophysis caudata*

M. Luisa Fernández^{1*}, Aúrea Míguez¹, Ana Martínez¹, Ángeles Moroño², Fabiola Arévalo², Yolanda Pazos², Covadonga Salgado², Jorge Correa², Juan Blanco³, Sonsoles González-Gil⁴, Beatriz Reguera⁴

¹European Union Reference Laboratory on Marine Biotoxins. Aptdo. 90, 36271 Vigo, Spain.

²Centro de Control do Medio Mariño. Peirao de Vilaxoán s/n, 36600 Vilagarcía, Pontevedra, Spain.

³Centro de Investigacións Mariñas. Aptdo. 13, 36620 Vilanova de Arousa, Pontevedra, Spain.

⁴Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo. Subida a Radiofaro 50-52. Cabo Estay, Canido, 36390 Vigo, Spain

*Present address: Centro Tecnológico del Mar. Eduardo Cabello s/n, Bouzas. 36208 Vigo, Spain.

ABSTRACT

Dinophysis acuta co-occurring with smaller numbers of *D. caudata* and *D. rotundata*, may constitute an important component of the *Dinophysis* assemblage responsible for autumn (September-October) outbreaks of Diarrhetic Shellfish Toxicity (DST) in the Galician Rías Baixas (NW Spain). Previous HPLC-FD analysis of mussels, phytoplankton net-hauls and *Dinophysis* cells from the Galician Rías Baixas had shown that OA and DTX2 were the main diarrhetic toxins associated with the DST events. But data from recent years showed that several *Dinophysis* spp, besides *D. fortii*, were the source of pectenotoxins found in Asiatic and European bivalves. The presence of pectenotoxins was explored in mussels and phytoplankton net-hauls from the Rías of Pontevedra and Vigo (Rías Bajas), collected in different seasons and when the plankton populations were dominated by different *Dinophysis* spp, applying HPLC-MS techniques. Our results show that i) PTX2 and PTX2SA occurred in mussels and in plankton populations when *D. acuta* and *D. caudata* concentrations increased and ii) Pectenotoxins may be the predom-

inant toxins of the lipophilic-toxin-complex in plankton and mussels from the Galician Rías Baixas during autumn proliferations of *D. acuta* and *D. caudata*. This is the first report of PTX2 and PTX2SA in phytoplankton and mussels from Galicia.

KEY WORDS: Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins, *Dinophysis* spp, okadaic acid (OA), dinophysistoxins (DTXs), pectenotoxins (PTXs), liquid chromatography - mass spectrometry (LC-MS).

INTRODUCTION

Proliferations of *Dinophysis* spp. associated with detection of Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) toxins in bivalves above regulatory levels (DST events) constitute a chronic problem that affects the potent shellfish industry of the Galician Rías (NW Spain) (Reguera et al. 1993, Blanco et al. 1995, 1998), an area of intensive cultivation of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in floating rafts ($250 \cdot 10^3$ t per year). DST events are most persistent in the “Rías Baixas” (south of Cape Finisterre) and especially in the southernmost Rías of Vigo and Pontevedra (Fig. 1). Thus, during an unlucky year, as it was the case in 1994, PSP followed by DSP toxin levels above regulatory limits led to closures of mussel extraction from some parts of Ría de Pontevedra up to 45 weeks (Arévalo et al. 1996). *Dinophysis acuminata* is with no doubt the main agent of DST events in Galicia because its populations are very persistent and isolated cells of this species can be observed the whole year round. Nevertheless, seasonal species such as *Dinophysis acuta* co-occurring with smaller numbers of *D. caudata* and *D. tripos* may eventually constitute the dominant component of the *Dinophysis* assemblage responsible for autumn (September-October) DST events. Up until 1992, okadaic acid (OA) was the only diarrhetic toxin known to affect bivalves in Galicia (Lee et al. 1989; Rodríguez-Vázquez et al. 1989), but inconsistencies between mouse bioassays and OA content determined by HPLC led us to suspect the presence of other toxic components (Arévalo et al. 1994). The lack of commercial standards different from OA did not help to solve these uncertainties as quickly as desired. After the identification of DTX2 in Irish mussels, chromatographic peaks with retention times similar to those of DTX2 were found in phytoplankton net-hauls and mussel samples between 1990 and 1992 (Blanco et al. 1995). DTX2 was finally identified in Galician mussels by LC-MS (Gago et al. 1996). *D. acuta*, the main contributor of DTX2 in Irish mussels, was suspected to play the same role for Portuguese and Galician shellfish. In addition to OA and DTX2, acyl derivatives of the latter toxins were detected in mussels (Fernández et al. 1996).

Previous HPLC-FD analysis of *Dinophysis acuta* and *D. caudata* cells from the Galician Rías Baixas, isolated one by one by micromanipulation, showed that OA and DTX2 were present in *D. acuta* cells in a 3:2 ratio and that *D. caudata* had traces of OA (Fernández et al. 2001). Nevertheless, data from recent years showed that several *Dinophysis* spp, besides *D. fortii*, were the source of pectenotoxins found in Asian and European bivalves (Daiguji et al. 1998, Draisci et al. 1996, Suzuki et al. 1998), a finding that turned as mandatory the monitoring of these toxins in Galician shellfish during *Dinophysis* blooms. Preliminary results are presented here on HPLC-MS toxin analyses of: i) phytoplankton net-haul samples from different station in the Rías of Pontevedra and Vigo, rich in *D. acuta*, *D. caudata* and/or *D.*

acuminata, collected during spring (June) and autumn (October) DST events, and ii) mussels collected from one station in Ría de Pontevedra in October 1994 and 1997. This is the first report of PTX2 in phytoplankton populations and PTX2SA in phytoplankton and mussels from the Galician Rías Baixas.

MATERIAL AND METHODS

Phytoplankton net-hauls and mussel samples were collected at different stations from Ría de Pontevedra and Ría de Vigo (Fig. 1).

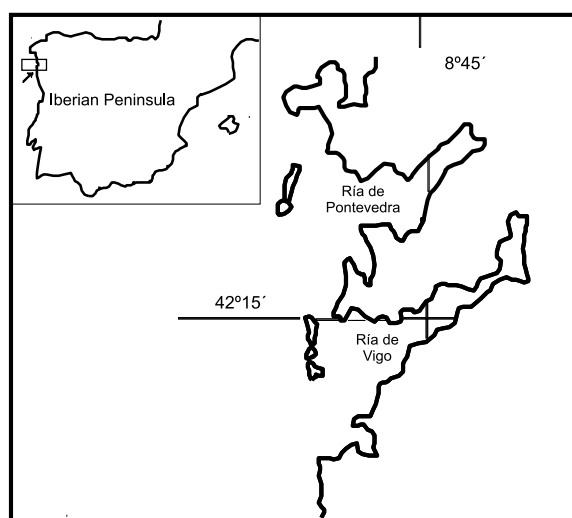


Fig. 1. Location of Ría de Pontevedra and Ría de Vigo, the two southernmost of the four Galician Rías Baixas (NW Spain).

Phytoplankton Samples

Samples 5, 6 and 7 from Bueu (Ría de Pontevedra) were obtained by vertical phytoplankton net-hauls (10 μm mesh size). A sample of the net-haul suspension was removed and fixed with lugol for further quantitative analyses of *Dinophysis* cells of 3mL sedimented in chambers and counted by the Utermöhl method. The remainder, after measuring its volume, was concentrated by centrifugation. The pellet was resuspended in 0.5 mL of Tris-HCl buffer and immersed in boiling water to inactivate the enzymes as described by Quilliam et al. (1996). Further, 2 mL of methanol were added and sonication applied for 5 min to break the cells. Following centrifugation, the supernatant was taken and kept frozen until LC-MS analysis.

The other phytoplankton samples, from different stations in the Rías of Vigo and Pontevedra, were collected by oblique hauls of two superimposed phytoplankton nets, 100 μm -mesh the inner one and 20 μm -mesh the outer one with the collector, so the 20-100 μm size fraction was retained. The net-haul volume was measured after removing an aliquot, and filtered on board through pre-combusted (400 °C during 6 h) Whatman GF/F filters. The filters were folded inside a tube and imme-

diately frozen until time of analysis. *Dinophysis* spp. concentrations were estimated from 2-3 counts of 1 mL-subsamples in Sedgewick-Rafter chambers. Toxin extraction was performed by sonication of the filter with 80% methanol for 5 min. After centrifugation, the supernatant was taken and kept frozen until LC-MS analysis. Sample 8 from Limens (Ría de Vigo) was an exception in that this net-haul, containing only dinoflagellates and a strong dominance of *D. acuta*, was kept alive in a culture chamber at the laboratory for several days before extraction.

Mussel Samples

Mussel samples were collected in Bueu (Ría de Pontevedra) in October 1994 and October 1997. Digestive glands were homogenized and 1 g-portions were extracted with 4 mL of 80% methanol. After centrifugation, an aliquot of the supernatant was filtered through 0.45 μ m for further LC-MS injection. Mussels from these two samples had been exposed to phytoplankton populations commonly observed at the end of the upwelling season, with practical absence of diatoms and predominance of large dinoflagellates (mainly *Dinophysis* spp.) and small flagellates. The most abundant *Dinophysis* species were *D. acuminata* and *D. acuta*, followed by smaller numbers of *D. caudata* and *D. tripos* in 1994, and of *D. caudata* in 1997.

Liquid Chromatography – Mass Spectrometry Analyses:

LC-MS analyses were performed using a Finnigan MAT P4000 quaternary pump and a Finnigan AS 3000 autosampler, coupled with an ion trap LCQ-DUO Mass Spectrometer equipped with an atmospheric pressure ESI interface.

Chromatographic conditions: Chromatographic separation was carried out on a X Terra MS C8, 150 mm x 2.1 mm i.d. column packed with 5 μ m particles. Methanol:Water, 70:30 containing 0.1 % acetic acid, the same mobile phase as that proposed by Ofuji et al. (1999) for azaspiracids, was used at a flow rate of 0.2 mL/min. The injection volume was 5 μ L.

Mass spectrometry conditions: The temperature of the heated capillar was 250° C and the capillary voltage, 5.55 V. High purity nitrogen was used. The sheath gas operating pressure was 50, and that of the auxiliary gas 20 units. For all samples, and for each chromatographic run, two scan events, a full scan positive ion ESI MS and a full scan positive MS/MS were performed simultaneously. Full scan spectra were collected from 200 to 1200 m/z. Ion monitoring was performed on the sodium adduct that yielded for PTX2 a full scan mass spectra exhibiting $[M+Na]^+$ at m/z 881.5. Collision induced MS-MS was performed on the parent ion $[M+Na]^+$ by using 50% collision energy. The predominant fragment was m/z 837.5. In addition to PTX2, PTX2SA could be monitored at m/z 899.5. OA and DTX2, when present, could be detected under the above conditions at m/z 827.5. For all the analyses, the $[M+Na]^+$ adduct was the principal ion detected with very low or undetectable signal for the ion peaks corresponding to $[M+H]^+$.

Toxin standards: PTX2 standard was a generous gift from Professor T. Yasumoto and DTX2 from Dr K. James. OA was obtained from the National Research Council (Canada).

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the toxin content of the samples analyzed. Neither PTXs nor DTX2 at detectable levels were observed in a phytoplankton net-haul (sample # 1) rich in *Dinophysis acuminata* from late spring (June) that showed a toxin profile dominated by OA. This is in agreement with previous results obtained by HPLC-FD, that showed OA and some of its conjugated forms as the main toxins found in single cell isolates of *D. acuminata* (Fernández et al. 2001) and in phytoplankton net-hauls where *D. acuminata* was the dominant species (Moroño et al. 2003). The other phytoplankton net-hauls from early autumn (September-October) rich in large *Dinophysis* spp., such as *D. acuta*, *D. caudata* and *D. tripos* showed that PTX2 can be present in similar concentrations than OA and its analogues or even be the dominant toxin. Fig. 2 shows the LC-MS and LC-MS/MS chromatograms corresponding to the extract of a plankton net-haul (sample # 8) collected in October 1997 in Limens (Ría de Vigo), mainly composed of *Dinophysis* spp, with *D. acuta* as the dominant species, and illustrates the complexity of the toxin profile dominated by OA, DTX2 and PTX2.

Table 1. Toxin content determined by LC-MS in phytoplankton net-hauls (pg/cell of *Dinophysis*) and in mussels ($\mu\text{g/g}$) from the Galician Rías of Pontevedra (P) and Vigo (V). For each net-haul sample, the total number of cells of *Dinophysis* species and of each species of *Dinophysis* contained in the filter is given. (nd = not detected).

Sample	Plankton net-haul (> 10-20 μm)							Incubated net-haul	Mussels	
#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Location	Borneira (V)	Boca Sur (V)	Bueu (P)	Combarro (P)	Bueu (P)	Bueu (P)	Bueu (P)	Limens (V)	Bueu (P)	Bueu (P)
Date	Jun 91	Oct 94	Oct 97	Oct 97	Oct 01	Oct 01	Oct 01	Oct 97	Oct 94	Oct 97
	N° Cells									
<i>D. acuminata</i>	263750	112423	1300	3300	21695	16313	5549	1338		
<i>D. acuta</i>	nd	24125	550	1000	348637	202489	124453	28809		
<i>D. caudata</i>	nd	22678	1450	200	245879	159266	96030	2328		
<i>D. fortii</i>	nd	nd	nd	nd	3699	2018	1009	58		
<i>Dinophysis</i> spp.	8250	29433	900	700				2444		
<i>Dinophysis</i> Total	279000	188659	4200		639751	394210	233588	34978		
PTX2 pg/cell $\mu\text{g/g}$ meat	nd	0.24	1.54	0.1	0.90	0.40	2.50	2.9	$0.03 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	$0.03 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
OA pg/cell $\mu\text{g/g}$ meat	9.2	1.0	3.1	nd	nd	nd	nd	8.3	$3.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	$1.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
DTX2 pg/cell $\mu\text{g/g}$ meat	nd	0.24	nd	nd	nd	nd	nd	7.9	nd	$0.23 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
PTX2SA:PTX2 (area ratio)		5.97						0.27	14.17	34.42
PTX2SA:OA (area ratio)		1.32						0.09	0.11	1.30

Correlation between the total number of *Dinophysis* cells and the global toxin content in extracts from phytoplankton net-hauls was very poor. These results show that the proportion of different lipophilic toxins (i.e. OA derivatives and pectenotoxins) varies significantly between samples.

toxins) in the toxin profile from the assemblage of *Dinophysis* can be very variable in different years or even during different seasons in the same year. They also show, as previously described, the high variability in toxin content found in natural populations of *Dinophysis* (Andersen et al. 1996, Blanco et al. 1995, Fernández et al. 2001, Suzuki et al. 1997). Moreover, estimates of toxin content per cell of *Dinophysis* from phytoplankton net-hauls have been found to be up to an order of magnitude lower than values obtained from single cell isolation by microcapillarity (Masselin et al. 1992, Fernández et al. 2001). Similar observations were reported from HPLC analyses by Masselin et al. (1992).

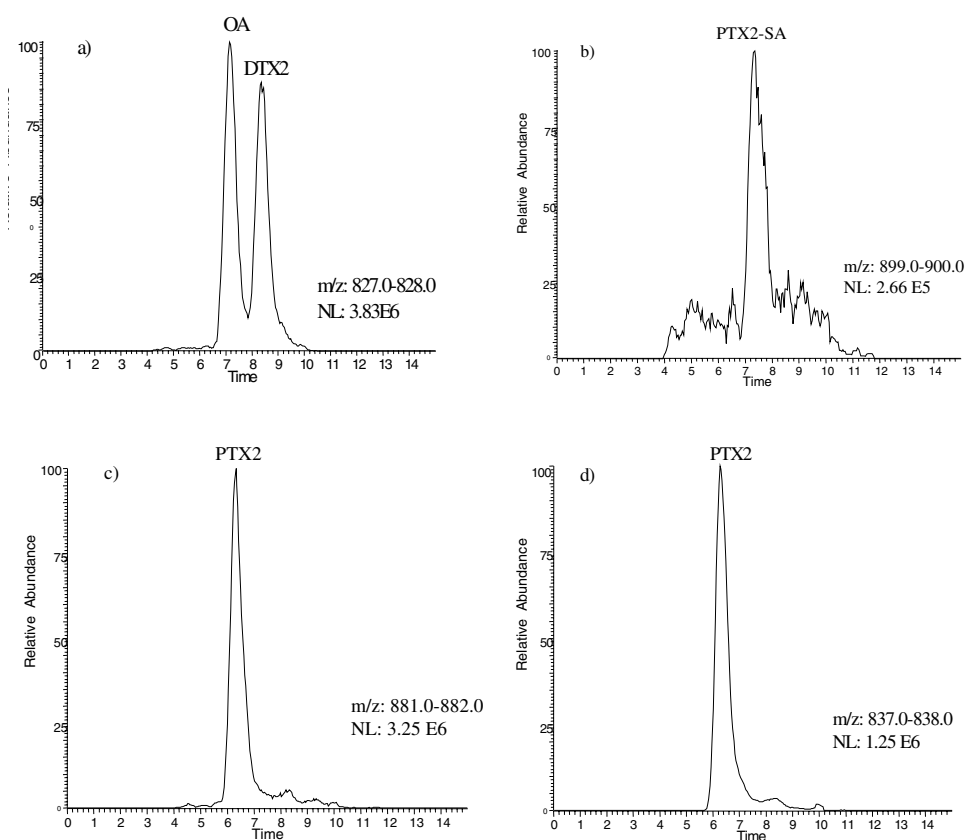


Fig. 2. LC-MS chromatograms of a phytoplankton sample collected from Limens (Ría de Vigo) in 1997. a) extracted ion mass chromatogram (m/z 827.0-828.0) (OA and DTX2); b) extracted ion mass chromatogram (m/z 899.0-900.0) (PTX2-SA); c) extracted ion mass chromatogram (m/z 881.0-882.0) (PTX2); d) extracted LC-MS/MS ion mass chromatogram (m/z 837.0-838.0) (PTX2).

PTX2SA was found in two plankton net-haul samples (# 2 and 8), and was the dominant pectenotoxin in the sample from 1994 (# 2). Previous studies have shown a predominance of seco-acid derivatives of PTXs in shellfish but not in plankton populations (Suzuki et al. 2001). The high amount of PTX2SA found in these sam-

ples was not necessarily produced by *Dinophysis* spp., and may have been produced by other members of the microplankton that fed on *Dinophysis*, or rather resulted from enzymatic conversion of PTX2 after the net-haul material was filtered and stored. To avoid the enzymatic conversions it would have been required to deep-freeze the sample immediately at much lower temperatures than those from the small domestic freezers on board. *Epi*PTX2SA, in considerably lower amounts than PTX2SA, was also detected both in the plankton net-hauls and shellfish samples whenever the latter toxin was present. *Dinophysis acuta* and *D. caudata* are most likely the major contributors of PTXs contaminating shellfish in the autumn, but the production of these toxins by other *Dinophysis* spp. from the region, such as *D. tripos* and *D. rotundata*, present in lower concentrations, or even by *Dinophysis acuminata*, despite the lack of PTXs in the few samples analyzed containing only this species of *Dinophysis*, can not be discarded.

In mussels exposed to autumn populations of phytoplankton, where diatoms were practically absent and dinoflagellates were dominated by *Dinophysis* spp. (*D. acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata*), PTX2SA was the dominant pectenotoxin, and PTX2 levels were considerably lower than those of their seco-acid derivatives (Table 1, samples 9 and 10). Fig. 3 shows the LC-MS chromatogram from a mussel sample collected in Bueu (Ría de Pontevedra) in October 1997. If the PTX2SA found in some of our plankton net-hauls were the result of transformation from poor handling, results presented here on pectenotoxins in shellfish are in agreement with previous reports that support that PTX2 is converted to PTX2SA after enzymatic oxidation in shellfish tissues (Suzuki et al. 2001). Although the lack of PTX2SA standards did not allow its quantification, our results suggest that in shellfish tissues this toxin may be present at similar or even higher concentrations than those of OA and DTX2.

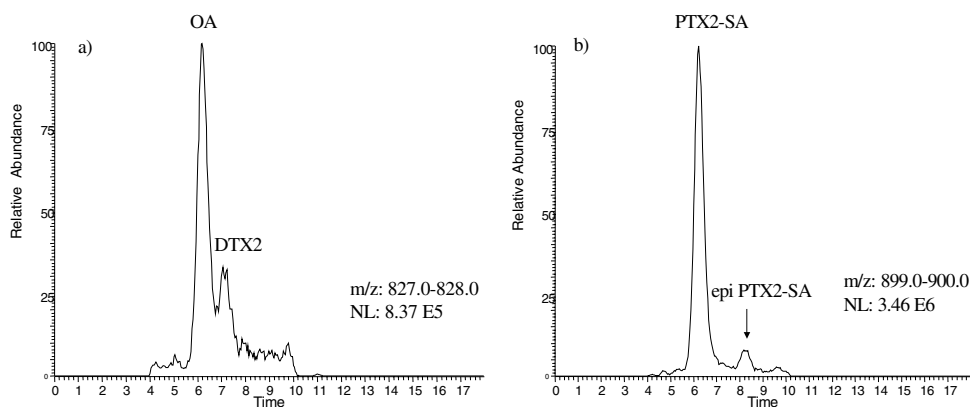


Fig. 3. LC-MS chromatograms from of mussel sample collected in Bueu (Ría de Pontevedra) in October 1997. a) extracted ion mass chromatogram (m/z 827.0-828.0) (OA and DTX2); b) extracted ion mass chromatogram (m/z 899.0-900.0) (PTX2-SA and epi PTX2-SA).

Observations presented in this paper show that PTX2 can be a major component of the lipophylic-toxin-complex-profile found in phytoplankton and PTX2SA

in shellfish from the Galician Rías exposed to autumn proliferations of *D. acuta* and *D. caudata*.

The routine application of mouse bioassays for the determination of toxins in shellfish allows the detection of OA derivatives, some PTXs and other lipophilic toxins. Monitoring programmes based only on targetted methods, such as HPLC-FD or enzymatic assays that estimate OA and its derivatives, are inadequate to protect public health in areas where there is a risk of occurrence of PTXs and other lipophilic toxins. Standards for the other toxins are not commercially available and only a few regulatory centres produce them for their own use. LC-MS multi-toxin analysis may be a good alternative to the mouse assay when toxin standards become available.

The EU has recently regulated a maximum level for PTXs and established that if chemical methods are used, PTX1 and PTX2 should be monitored (Anonymous 2002). Considering the important contribution of PTX2SA to the toxin profile observed in mussels from Galicia and other European regions, and the fact that this toxin is not detected by mouse bioassays based on intraperitoneal injection (Daiguji et al. 1998, Anonymous 2001) toxicological studies are urgently needed to elucidate the risk for public health associated with the ingestion of seco-acid derivatives in shellfish.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially funded with projects MAR98-0978 and MAR99-0224.

LITERATURE CITED

- Andersen, P., B. Hald & H. Emsholm. 1996. Toxicity of *Dinophysis* in Danish coastal waters. In: T. Yasumoto, Y. Oshima & Y. Fukuyo, editors. Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan. pp. 281-284.
- Anonymous. 2001. Report of the working group on toxicology of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) and azaspiracid shellfish poisoning (AZP). Commission of the European Communities, Brussels, 21-23 May 2001, 24 pp.
- Anonymous. 2002. Commission Decision 2002/225/EC from 15 March 2002, laying down detailed regulations for the application of Council Directive 91/492/EEC. *Off. J. Eur. Communities* L 075: 62-64.
- Arévalo, F., J. A. Valcárcel, M. Domonte & M. J. Vázquez. 1994. Estudio comparativo de los resultados obtenidos por bioensayo y HPLC en la determinación de biotoxinas DSP. Datos preliminares. In: J. Mariño & J. C. Maneiro, editors. Actas de la III Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Consellería de Pesca Marisqueo e Acuicultura, Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, Spain. pp. 89-93.
- Arévalo, F., M. Bermúdez de la Puente, M. Domonte, M. Pérez, C. Salgado, M. J. Vázquez & J. A. Valcárcel. 1996. Biotoxinas PSP y DSP en las Rías Gallegas: Control y evolución durante los años 1993 y 1994. In: E. Matamoros & M. Delgado, editors. IV Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Actas de la Reunión. Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain. pp. 39-51.
- Blanco, J., M. L. Fernández, J. Mariño, B. Reguera, A. Míguez, J. C. Maneiro, E. Cacho, E. & A. Martínez. 1995. From *Dinophysis* spp. toxicity to DSP outbreaks: A preliminary model of toxin accumulation in mussels. In: P. Lassus, G. Arzul, E. Erard-Le Denn, P. Gentien & C. Marcaillou-Le Baut, editors. Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier Publishing Ltd., París. pp. 777-782.
- Blanco, J., A. Moroño, Y. Pazos, J. Maneiro & J. Mariño, J. 1998. Trends and variations of the abundance of main PSP and DSP producing species in the Galician Rías: environmental and biological influences. In: B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernández & T. Wyatt, editors. Harmful Algae. Xunta de

- Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, Spain. pp. 204-207.
- Daiguji, M., M. Satake, K. J. James, A. Bishop, L. MacKenzie, H. Naoki & T. Yasumoto. 1998. Structures of new pectenotoxin analogs, pectenotoxin-2 seco acid and 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid, isolated from a dinoflagellate and greenshell mussels. *Chem. Lett.* 7: 653-654.
- Draisci, R., L. Lucentini, L. Giannetti, P. Boria & R. Poletti. 1996. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon* 34:923-935.
- Fernández, M. L., A. Míguez, E. Cacho & A. Martínez. 1996. Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. *Toxicon* 34: 381-387.
- Fernández, M. L., B. Reguera, I. Ramilo & A. Martínez. 2001. Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from the Galician Rías Bajas. In: G. M. Hallegraeff, S. I. Blackburn, C. J. Bolch & R. J. Lewis, editors. Harmful Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, France. pp. 360-363.
- Fernández, M. L., B. Reguera, P. Lourés & A. Míguez. 2002. First report of pectenotoxins in isolated *Dinophysis caudata* cells determined by Liquid Chromatography - Mass Spectrometry. In: Abstracts of the X International Conference on Harmful Algal Blooms, St. Petersburg, Florida, USA, October 2002. p. 91.
- Gago, A., J. A. Rodríguez-Vázquez, P. Thibault & M. Quilliam. 1996. Simultaneous occurrence of diarrhetic and paralytic shellfish poisoning toxins in Spanish mussels in 1993. *Nat. Tox.* 4:72-79.
- Lee, J.-S., T. Igarashi, S. Fraga, E. Dahl, P. Hovgaard & T. Yasumoto. 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.* 1:147-152.
- Masselin, P., P. Lassus & M. Bardouil. 1992. High performance liquid chromatography analysis of diarrhetic toxins in *Dinophysis* spp. from the French coast. *J. Appl. Phycol.* 4:385-389.
- Moroño, A., F. Arévalo, M. L. Fernández, J. Maneiro, Y. Pazos, C. Salgado & J. Blanco. 2003. Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*. *Aquat. Toxicol.* 62:269-280.
- Ofuji, K., M. Satake, Y. Oshima, T. McMahon, K. J. James & T. Yasumoto. 1999. A sensitive and specific determination method for azaspiracids, principal toxins of azaspiracid poisoning, by liquid chromatography/mass spectrometry. *Nat. Tox.* 7:247-250.
- Quilliam, M. A., W. R. Hardstaff, N. Ishida, J. L. McLachlan, A. R. Reeves, N. W. Ross & A. J. Windust. 1996. Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods. In: T. Yasumoto, Y. Oshima. & Y. Fukuyo, editors. Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan. pp. 289-292.
- Rodríguez-Vázquez, J. A., A. Gago, Y. Oshima, K. Sugino, J. S. Lee & T. Yasumoto. 1989. Analyses of toxins in mussels from the Atlantic coast of Spain. In: S. Natori, K. Hashimoto & Y. Ueno, editors. Mycotoxins and Phycotoxins'88. Elsevier, Amsterdam. pp. 367-375.
- Suzuki, T., T. Mitsuya, M. Imai & M. Yamasaki. 1997. DSP toxin contents in *Dinophysis fortii* and scallops collected at Mutsu Bay. *J. Appl. Phycol.* 8:509-515.
- Suzuki, T., T. Mitsuya, H. Matsubara & M. Yamasaki. 1998. Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate *Dinophysis fortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection. Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallop. *J. Chromatog. A* 815:155-160.
- Suzuki, T., L. Mackenzie, D. Stirling & J. Adamson. 2001. Pectenotoxin-2 seco acid: a toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand Greenshell mussels, *Perna canaliculus*. *Toxicon* 39:507-514.

ARTÍCULO 5:

Pectenotoxin 2 in single cells isolates of
Dinophysis caudata and *Dinophysis acuta* from the Galician
Rías (NW Spain).

Fernández, M.L., Reguera, B., Gonzalez-Gil, S. and Míguez, A. 2006. *Toxicon* 48, 477-490.

Pectenotoxin 2 in single cells isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rías (NW Spain)

RESUMEN

Dinophysis acuta y *D. caudata* son componentes estacionales de la comunidad de dinoflagelados de las Rías Bajas Gallegas. Estas especies pueden ser los principales contribuyentes a la ocurrencia de Toxinas Lipofílicas de los Moluscos en septiembre-octubre, dando lugar a la prohibición de la recolección en un área de intensa actividad de maricultura (250×10^3 t de mejillones cultivados y 60×10^3 t de otros moluscos de bancos naturales, por año). Análisis previos por HPLC de AO y derivados en estas dos especies revelaron cantidades significativas de AO y DTX2 en *D. acuta*, pero solo cantidades traza de AO en *D. caudata*, y llevaron a la errónea conclusión de que la contribución de esta última especie era irrelevante. Análisis recientes por LC-MS/MS de células de *D. acuta* y *D. caudata* aisladas individualmente han mostrado que ambas especies pueden tener niveles elevados de PTX2 (hasta 30 pg y 130 pg cel⁻¹ respectivamente) y que esta toxina puede ser la toxina dominante durante los episodios tóxicos asociadas a *Dinophysis* spp. Aunque la rápida conversión de PTX2 a PTX2SA que tiene lugar en los mejillones pudiera reducir el riesgo de estas toxinas para la salud humana, estos resultados tienen implicaciones importantes para los programas de monitorización. Los complejos perfiles tóxicos de los moluscos expuestos a poblaciones de *Dinophysis* spp deben ser tenidos en cuenta a la hora de tomar decisiones en cuanto a los métodos de control de toxinas que deben ser utilizados como base de dichos programas. Se requieren estudios toxicológicos concluyentes para elucidar la relevancia desde el punto de vista de la salud pública de las diferentes PTXs para proporcionar la base científica de las regulaciones.

Pectenotoxin-2 in single-cell isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rías (NW Spain)

M. Luisa Fernández^{a,*}, Beatriz Reguera^b, Sonsoles González-Gil^b, Aúrea Míguez^c

^aCentro Tecnológico del Mar, Fundación CETMAR, Eduardo Cabello s/n, 36208 Vigo, Spain

^bInstituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, Cabo Estay, Canido, Aptdo. 1552, 36200 Vigo, Spain

^cSanidad Exterior, Estación Marítima s/n, 36271 Vigo, Spain

Received 23 December 2005; accepted 30 May 2006

Available online 28 June 2006

Abstract

Dinophysis acuta and *Dinophysis caudata* are seasonal components of the dinoflagellate community in the Galician Rías Bajas (NW Spain). These species can be the main contributors to the occurrence of Lipophilic Shellfish Toxins (LST) in September–October, leading to prohibition of harvesting in an area of intensive mariculture (250 × 10³ t of cultured mussels, 60 × 10³ t of other shellfish in natural banks, per year). Previous analyses of okadaic acid (OA) and related toxins in these two species by HPLC revealed significant amounts of OA and DTX2 in *D. acuta*, but only trace amounts of OA in *D. caudata* cells, and led to the erroneous conclusion that the contribution of the latter species to autumn LST events was negligible. Recent analyses by LC–MS/MS of individually picked cells of *D. acuta* and *D. caudata* have shown that both species may have high levels of PTX2 (up to 30 pg and 130 pg cell^{−1}, respectively) and that this toxin can be the dominant toxin during toxic outbreaks associated with *Dinophysis* spp. Although the quick conversion of PTX2 to PTX-2SA in mussels may reduce the risks for human health, these results have important implications for monitoring programmes. The complex toxin profile of shellfish exposed to *Dinophysis* spp. populations should be taken into account when making decisions on the toxin control methods to be used as the basis of the programme. Conclusive toxicological studies are required to elucidate the public health relevance of the different PTXs derivatives and to provide the scientific basis for regulations.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Dinophysis caudata*; *Dinophysis acuta*; *Dinophysis*-toxins; Pectenotoxin-2; Liquid chromatography–tandem mass spectrometry; Galicia

1. Introduction

The dinoflagellate *Dinophysis caudata* occurs in tropical, subtropical and warm-temperate seas.

Proliferations of this species have been associated with diarrhetic shellfish intoxications (DSP) in the Adriatic Sea (Poletti et al., 1998), Black Sea (Vershinin and Kamnev, 2001), Northeast Atlantic waters in Southern Europe (Fernández et al., 2001) and Morocco (Tahri-Joutei, 1998), Pacific coasts of Mexico (Flores et al., 2002), South western Atlantic (Méndez and Ferrari, 2002), Indian Ocean (Karunasagar et al., 1989), Southeast Asia (Fukuyo,

*Corresponding author. Tel.: +34 986 24 70 47;
fax: +34 986 29 60 19.

E-mail address: mfernandez@cetmar.org
(M. Luisa Fernández).

1990; Tseng et al., 1993; Marasigan et al., 2001; Holmes and Teo, 2002) and Australia (Burgess and Shaw, 2001). With the exception of high cell density reports ($1.5 \times 10^6 \text{ cell l}^{-1}$) from India (Santhanam and Srinivasan, 1996), *D. caudata* was usually present in moderate concentrations ($< 10^3 \text{ cell l}^{-1}$) and often mixed with other dominant *Dinophysis* spp.

Dinophysis acuta, a temperate-water species, is the main agent of DSP outbreaks in the Chilean (Guzmán and Campodonico 1975; Lembeye et al., 1993) and Norwegian fjords and on the Southwest coast of Ireland (McMahon and Silke, 1998), and an important contributor to these kind of events in New Zealand (MacKenzie et al., 1998) and the Atlantic coast of Iberia (Reguera et al., 1990; Sampayo et al., 1990).

Chronic, long lasting shellfish contamination with lipophilic toxins caused by *Dinophysis* spp. (Reguera et al., 1993; Blanco et al., 1995, 1998) constitute the main threat to shellfish-associated industries in the Galician Rías (Northwest Spain), an area with a yearly production of $250 \times 10^3 \text{ t}$ of raft-cultivated mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and 7.7×10^3 of other bivalves, such as clams (*Venerupis decussata*, *Venerupis pullastra*), cockles (*Cardium edule*), and scallops (*Pecten maximus*) from natural banks. In years with persistent contamination, as in 1994, some areas of Ría de Pontevedra were closed for 45 weeks (Arévalo et al., 1995). Early analyses of lipophilic toxins in Galician mussels by HPLC led to the conclusion that okadaic acid (OA) was the only toxin present at the time of *Dinophysis* occurrences (Rodríguez-Vázquez et al., 1989). In the 1990s, inconsistencies between mouse bioassays and OA content determined by HPLC led Galician experts to suspect the presence of other toxins in the mussels (Arévalo et al., 1994). The lack of commercial standards different from OA delayed resolution of these uncertainties until recently. After the identification of DTX2 in Irish mussels (Hu et al., 1992), chromatographic peaks with retention times similar to those of DTX2 were found in phytoplankton net-hauls and mussel samples from Galicia between 1990 and 1992 (Blanco et al., 1995). DTX2 was finally identified in Galician (Gago et al., 1996) and Portuguese (Vale and Sampayo, 1996) mussels. *D. acuta*, the main contributor of DTX2 in Irish mussels (James et al., 1997, 1999b), was suspected to play the same role for Portuguese and Galician shellfish. DTX2 was subsequently detected in Portuguese shellfish associated with

proliferations of *D. acuta* (Vale and Sampayo, 2000), and HPLC analyses of individually picked cells of *Dinophysis* from Galician coastal waters confirmed the presence of OA and DTX2 in *D. acuta* cells, and only traces of OA in *D. caudata* (Fernández et al., 2001).

Pectenotoxins (PTXs) are macrolactones that contain multiple polyether ring units and were first isolated from Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*) (Yasumoto et al., 1984; Murata et al., 1986). Pectenotoxin-seco acids (PTXSA) are PTX derivatives in which the lactone ring has been hydrolyzed (Fig. 1), and are mainly the result of bioconversion in shellfish or in mistreated phytoplankton samples (Suzuki et al., 1998, 2001). Traditionally okadaates, pectenotoxins and yessotoxins were included in the same group of toxins, the diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins (Yasumoto et al., 1984), despite the fact that only OA and derivatives had a clear diarrhetic effect after oral administration to mammals. The EU classified OA, DTXs and PTXs as DSP toxins and left YTXs as a separated group (Anonymous, 2002). Recently, a FAO/IOC/WHO Expert Consultation group separated them into three different groups of lipophilic toxins on the basis of their different biological effects, and suggested they should be regulated separately using different analytical techniques (Anonymous, 2004). For these reasons we use here the expression “Lipophilic Shellfish Toxins” (LST) when we refer to the toxin complex (okadaates and pectenotoxins) in *Dinophysis* cells.

Dinophysis fortii was the first dinoflagellate found to contain Pectenotoxin-2 (PTX2) as revealed by HPLC analyses of individually picked cells from Japanese waters (Lee et al., 1987). PTX2SA were first identified in net-hauls rich in *D. acuta* from Ireland (James et al., 1999a) and in Greenshell mussels from New Zealand (Daiguji et al., 1998). Improved analytical methods in recent years by LC–MS of plankton net-hauls rich in *Dinophysis* spp. (*D. acuta*, *D. fortii*) (Daiguji et al., 1998; Draisci et al., 1996; MacKenzie et al., 2005; Vale and Sampayo, 2002) and of isolated cell of *D. acuta* (Fernández-Puente et al., 2004) showed the presence of PTXs and their analogues and led to the suspicion of a widespread presence of pectenotoxins in *Dinophysis* spp. LC–MS analyses of Galician plankton-net-hauls rich in *D. acuta* and *D. caudata*, and mussels contaminated with these populations, revealed high levels of PTX2 in the plankton and of PTX2SA in the bivalves, and showed that, during

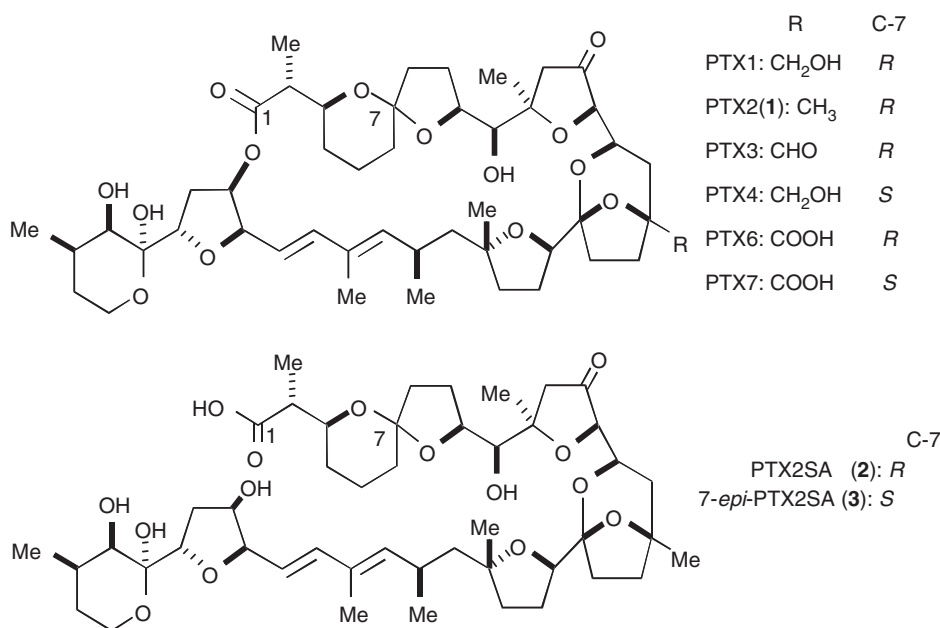


Fig. 1. Structures of pectenotoxin 2 (PTX2) and its analogue, pectenotoxin 2 seco acid (PTX2SA).

autumn toxic outbreaks, PTX2 and PTX2SA could be the dominant components of the lipophilic toxin complex (Fernández et al., 2003). These results prompted us to investigate the contribution of each species of *Dinophysis* to the pectenotoxin content in shellfish. Analyses by LC–MS of individually picked cells was applied as the most accurate technique to obtain unambiguous results on the toxin content in natural populations of *Dinophysis* species. This is the first report of PTX2 in isolated cells of *D. caudata*, and of PTX2 in *D. acuta* from the Galician Rías.

2. Material and methods

2.1. Phytoplankton sampling and extraction

Fig. 2 shows the location of the sampling stations. Vertical plankton net-hauls (20- μ m mesh size) were collected in Ría de Pontevedra in October 2001 at the time of proliferations of *D. acuta* and *D. caudata* (Fig. 3) that led to harvesting closures due to presence of lipophilic toxins in shellfish above regulatory levels. Cells of both species were individually picked by microcapillarity at the inverted microscope (25 \times and 100 \times), rinsed 2–3 times through filter-sterilized (0.22 μ m) seawater, and finally transferred to a drop of Tris–HCl buffer. Groups of 20–50 cells were placed in eppendorf

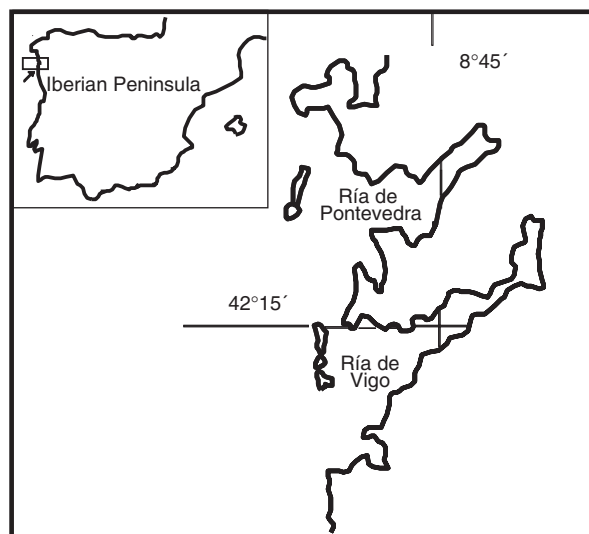


Fig. 2. Location of Ría de Vigo and Ría de Pontevedra, the two southernmost of the four Galician Rías Baixas.

tubes (1.5 ml) filled up to 0.5 ml with Tris–HCl, and the boiling procedure developed by Quilliam et al. (1996) for *Prorocentrum lima* cultures was applied to destroy the enzymes of *Dinophysis* cells and prevent hydrolysis of potentially present conjugated forms of the toxins. After centrifugation and elimination of the supernatant, the pellets were resuspended in 2 ml of methanol (MeOH) 80% and

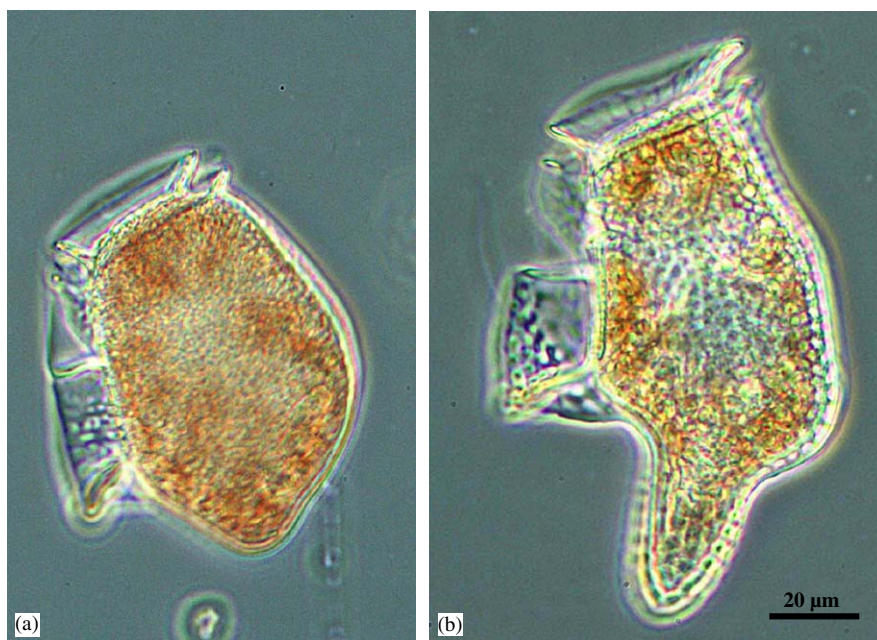


Fig. 3. Micrographs (phase contrast) of live specimen of (a) *Dinophysis acuta*, and (b) *Dinophysis caudata* from the Galician Rías Baixas.

sonication applied for 5 min to break the cells. Following centrifugation, the supernatant was taken and kept frozen until LC–MS analysis.

2.2. Liquid chromatography–FD analysis

Analysis of plankton net-hauls and picked cells of *Dinophysis* from previous studies in the Galician Rías (Fernández et al., 2001) were carried out by HPLC–FD according to Lee et al. (1987).

2.3. Liquid chromatography–mass spectrometry analyses

LC–MS analyses were performed using a Finnigan MAT P4000 quaternary pump and a Finnigan AS 3000 autosampler, coupled with an ion trap LCQ-DUO Mass Spectrometer equipped with an atmospheric pressure ESI interface.

Chromatographic separation was performed using an X Terra MS C8, 150 mm × 2.1 mm i.d. column packed with 5 μm particles. The mobile phase, that consisted of methanol:water at a ratio 70:30 with 0.1% acetic acid, was used at a flow rate of 0.2 ml/min, and was the same as that proposed by Ofuji et al. (1999) for azaspiracids. The injection volume was 5 μl.

The mass spectrometer was operated with a temperature of the heated capillary of 250 °C and a capillary voltage of 5.55 V. High-purity nitrogen was used. The sheath gas operating pressure was 50 and that of the auxiliary gas 20 units. For all samples, and for each chromatographic run, two scan events, a full scan positive ion ESI MS and a full scan positive MS/MS, were performed simultaneously. Full scan spectra were collected from 200 to 1200 m/z . Ion monitoring was performed on the sodium adduct that yielded for PTX2 a full scan mass spectra exhibiting $[M+Na]^+$ at m/z 881.5. This ion was used for quantification purposes. Collision induced MS–MS was performed on the parent ion $[M+Na]^+$ by using 50% collision energy. The predominant fragment was m/z 837.5. In addition to PTX2, PTX2SA could be monitored at m/z 899.5. Although the conditions were optimized for PTXs detection, OA and DTX2, when present, could be detected at m/z 827.5. For all the analytes, the $[M+Na]^+$ adduct was the principal ion detected with very low or undetectable signal for the ion peaks corresponding to $[M+H]^+$. Estimated detection limits (signal/noise = 3) were 50, 120 and 135 pg on column for PTX2, OA and DTX2, respectively. Due to the scarce number of samples and the small amount of PTX 2 standard available, recovery experiments were not feasible.

PTX2 standard was a generous gift from Prof. T. Yasumoto and DTX2 from Dr. K. James. OA was obtained from the National Research Council (Canada).

3. Results and discussion

Fig. 4 shows the LC–MS (Fig. 4a) and the LC–MS/MS (Fig. 4b) chromatograms of the PTX2 standard, and Figs. 5 and 6, those corresponding to picked cells of *D. acuta* and *D. caudata*, respectively. Under the LC–MS conditions used in the experiment, PTX2 was found to be the major component of the toxin profile of *D. acuta* and *D. caudata* cells

isolated by micromanipulation. Neither pectenotoxin-2 secoacids (PTX2SA) nor OA and DTX2 were detected in the picked cells. Table 1 shows the toxin content in the *D. acuta* and *D. caudata* samples analyzed. The PTX2 content per cell of *D. caudata* was high ($>100 \text{ pg cell}^{-1}$) in the three samples analyzed. The PTX2 content per cell was lower (30 pg cell^{-1}) in the case of *D. acuta*.

Results obtained on the toxin profile of *D. caudata* are not in disagreement with previous findings in the area (Fernández et al., 2001), during studies to estimate OA and derivatives, that showed the presence of OA only at trace levels in this species. Previous data on the toxin content of

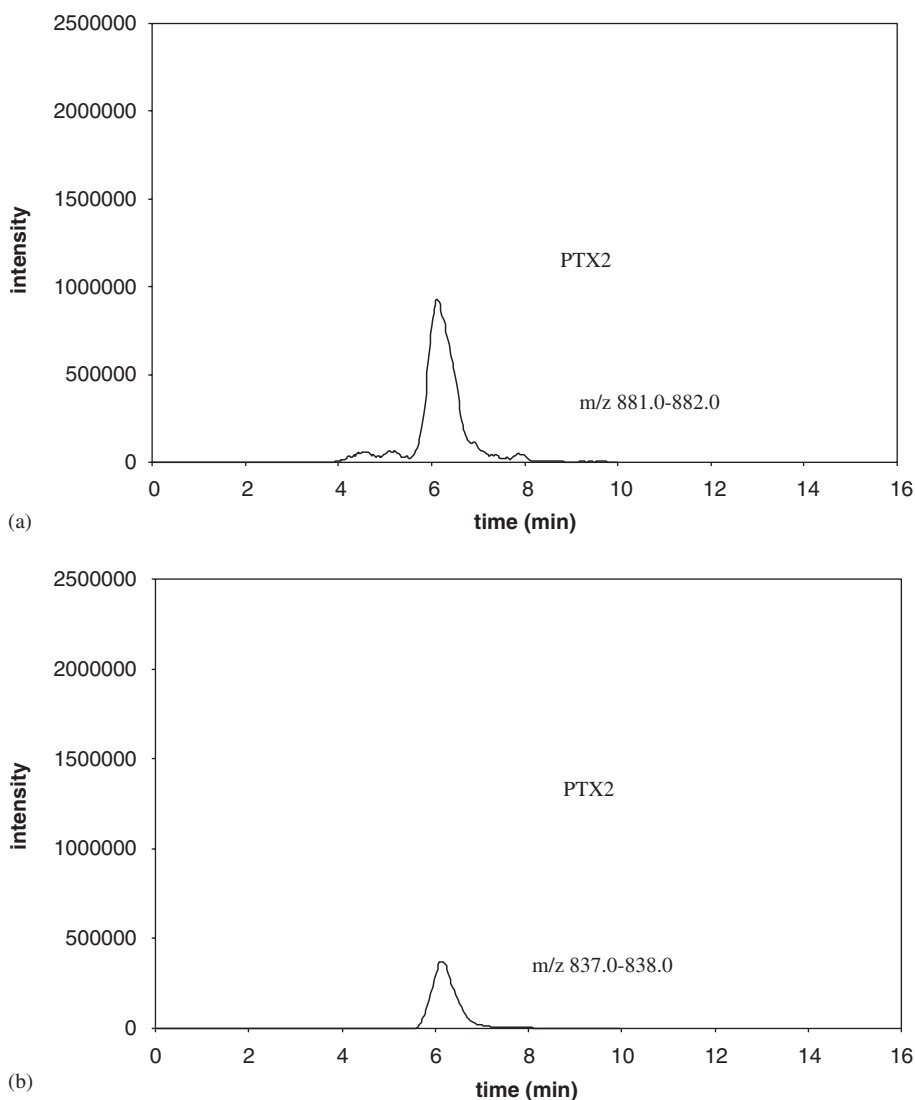


Fig. 4. LC–MS chromatograms of PTX2 standard: (a) Extracted ion mass chromatogram (m/z 881.0–882.0) (PTX2); (b) Extracted LC–MS/MS ion mass chromatogram (m/z 837.0–838.0) (PTX2).

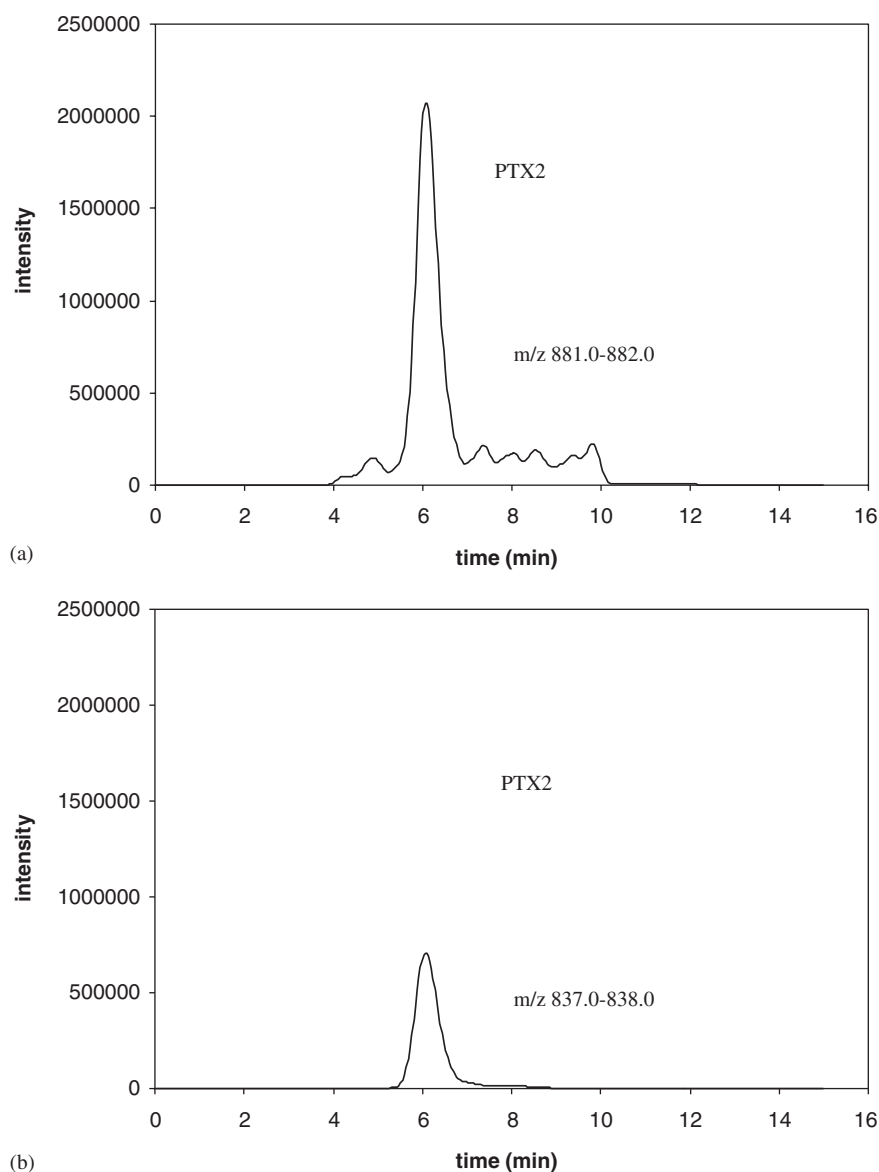


Fig. 5. LC–MS chromatograms of a sample of *Dinophysis acuta* cells: (a) extracted ion mass chromatogram (m/z 881.0–882.0) (PTX2); (b) extracted LC–MS/MS ion mass chromatogram (m/z 837.0–838.0) (PTX2).

plankton concentrates rich in *D. caudata* are very scarce. Fish mortalities associated with blooms of *D. caudata* have been reported in Japan (Okaichi, 1967) and Southern India (Santhanam and Srinivasan, 1996), but the real cause of fish death (anoxia, gill damage, toxins) was not investigated.

There have been previous reports (Holmes and Teo, 2002, Marasigan et al., 2001) of the presence of OA and derivatives in *D. caudata*. The only known references on pectenotoxin-derivatives related to *D. caudata* are from Australian authors (Eaglesham

et al., 2000; Burgess et al., 2003) who used net-hauls rich in *D. caudata* as a source to obtain PTX2SA. Our results here, the first ones obtained from single cell isolates, show that *D. caudata* may have very high levels of PTX2 (up to 130 pg cell^{-1}), that are within the range of total PTX content in *D. acuta* from New Zealand (MacKenzie et al., 2005). Table 2 summarizes previous results with net-hauls and single cell isolates of *Dinophysis* spp. from the Galician Rías. The presence of PTX2SA in some (but not all) plankton net-hauls rich in *D. caudata*

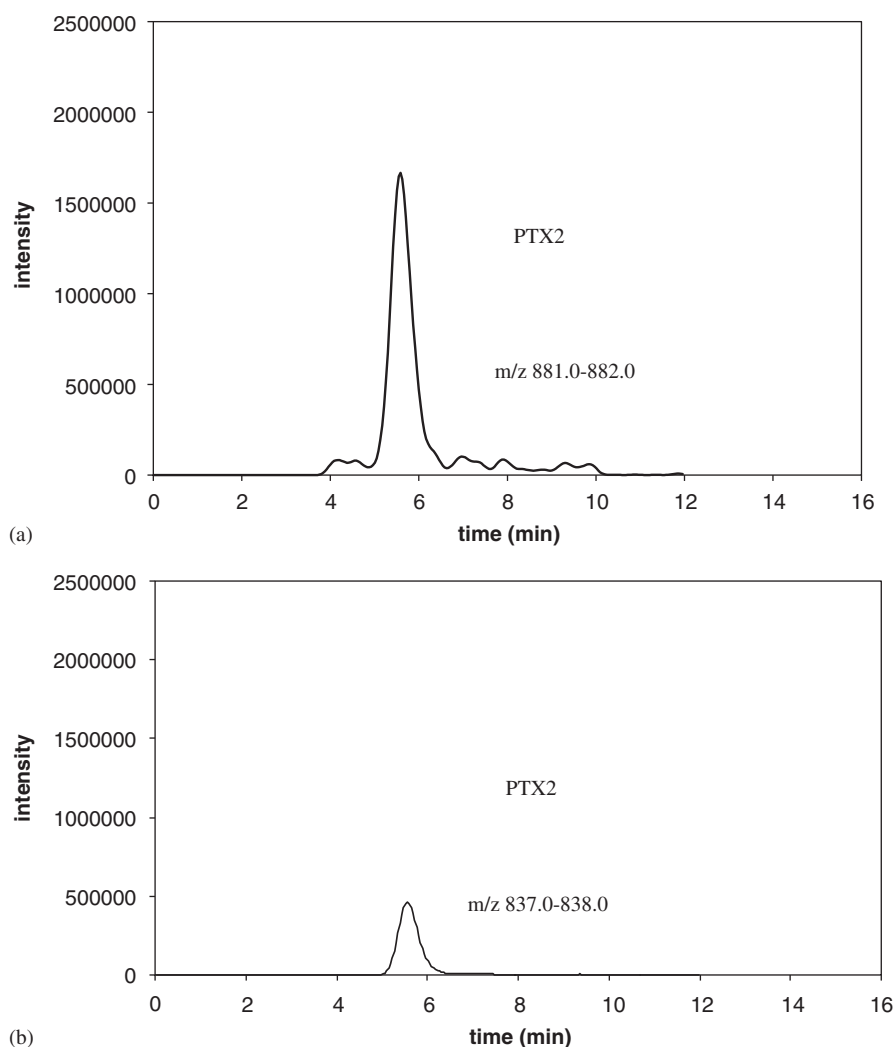


Fig. 6. LC–MS chromatograms of a sample of *D. caudata* cells: (a) extracted ion mass chromatogram (m/z 881.0–882.0) (PTX2); (b) extracted LC–MS/MS ion mass chromatogram (m/z 837.0–838.0) (PTX2).

Table 1

Toxin content per cell, determined by LC–MS, of *Dinophysis* in extracts from individually picked cells of *D. acuta* and *D. caudata*.

Species	Net-Haul date	Cell isolation date	No. of cell in sample	No. of cells injected	PTX2 (pg cell^{-1})
<i>D. acuta</i>	15.10.2001	16.10.2001	100	3.2	32.3
<i>D. acuta</i>	15.10.2001	16.10.2001	100	6.1	29.1
<i>D. caudata</i>	18.10.2001	18.10.2001	488	4.9	100.0
<i>D. caudata</i>	18.10.2001	22.10.2001	50	2.5	127.4
<i>D. caudata</i>	18.10.2001	22.10.2001	30	1.5	119.3

and *D. acuta* (Fernández et al., 2003), but its absence in the analyses of single cell isolates of the two species suggests, in agreement with the observations of Suzuki et al. (1998, 2001), that

PTX2SA is not present in whole cells of *Dinophysis*, but results from enzymatic conversions from the parent PTXs in net-haul material. MacKenzie et al. (2005) reported PTX2SA and PTX11SA in *D. acuta*

Table 2

Summary of previous results on toxin content determined by either HPLC–FD (Fernández et al., 2001) or LC/MS (Fernández et al., 2003) in phytoplankton net-hauls rich in *D. acuta* and *D. caudata* and in picked cells from the Galician Rías of Vigo and Pontevedra.

Species (cells)	Date location	PTX2 (pg cell ⁻¹)	OA (pg cell ⁻¹)	DTX2 (pg cell ⁻¹)	PTX2SA/PTX2 (area ratio)	PTX2SA/OA (area ratio)
<i>D. acuminata</i> (75044)	08/1990 ^a	ne	1.6	1.1		
<i>D. acuta</i> (507934)	Pontevedra					
<i>D. caudata</i> (5300)						
<i>D. acuta</i> (26928)	10/1990 ^a	ne	2.4	1.6		
<i>D. caudata</i> (528)	Pontevedra					
<i>D. acuta</i> (45425)		ne	0.4	0.25		
<i>D. caudata</i> (7820)	10/1990 ^a					
<i>D. rotundata</i> (115)	Pontevedra					
<i>D. acuta</i> (picked cells)	10/1997 ^a Vigo	ne	6.3 33.1	4.4 22.0		
<i>D. caudata</i> (picked cells)	10/1997 ^a Vigo	ne	18.4 0.73	5.7 nd		
<i>D. acuminata</i> (263750)	06/1991 ^b	nd	9.2	nd		
<i>Dinophysis</i> spp.(8250)	Vigo					
<i>D. acuminata</i> (112423)		0.24	1.0	0.24	5.97	1.32
<i>D. acuta</i> (24125)	10/1994 ^b					
<i>D. caudata</i> (22678)	Vigo					
<i>Dinophysis</i> spp (29433)						
<i>D. acuminata</i> (1338)		2.9	8.3	7.9	0.27	0.09
<i>D. acuta</i> (28809)	10.1997 ^b					
<i>D. caudata</i> (2328)	Vigo					
<i>D. fortii</i> (58)						
<i>D. acuminata</i> (1300)		1.54	3.1	nd		
<i>D. acuta</i> (550)	10/1997 ^b					
<i>D. caudata</i> (1450)	Pontevedra					
<i>Dinophysis</i> spp. (900)						
<i>D. acuminata</i> (21695)		0.90	nd	nd		
<i>D. acuta</i> (348637)	10/2001 ^b					
<i>D. caudata</i> (245879)	Pontevedra					
<i>D. fortii</i> (3699)						
<i>D. acuminata</i> (16313)		0.40	nd	nd		
<i>D. acuta</i> (202489)	10/2001 ^b					
<i>D. caudata</i> (159266)	Pontevedra					
<i>D. fortii</i> (2018)						
<i>D. acuminata</i> (5549)		2.50	nd	nd		
<i>D. acuta</i> (124453)	10/2001 ^b					
<i>D. caudata</i> (96030)	Pontevedra					
<i>D. fortii</i> (1009)						

ne = not explored; nd = not detected.

^aHPLC–FD.

^bLC–MS.

concentrates that had much higher levels of PTX2 and PTX11 than the Galician specimens. Cells from net-hauls may suffer rupture from handling, and

enzymatic conversions may take place very quickly if the samples are not treated for enzymatic inhibition, as was the case in the New Zealand

studies. Fernández-Puente et al. (2004) reported that percentages of PTX2SA in net-haul concentrates of *D. acuta* from Ireland were high only when those of PTX2 were low, which suggests conversions within the net-haul material. They also found PTX2SA and 7-epi-PTX2SA in enzymatically active samples of cell isolates (100–400 cells) of *D. acuta*. The absence of PTX2SA in our studies can be explained by the fact that we worked with small numbers of cells (50–100) that were carefully collected and immediately boiled and processed in the laboratory.

Nevertheless, results obtained for *D. acuta* cells from 2001, with a toxin profile composed only of PTX2 (up to 32 pg cell^{-1}) and without traces of OA

or DTX2, are surprising if compared with previous works by the same authors, who analyzed single cell isolates of the same species, from October 1997 following the procedure of Lee et al. (1987), and found that OA and DTX2, in a ratio of 3:2, were the main components of the toxin profile of *D. acuta* from the Galician Rias (see Table 2). Moreover, a net-haul sample from the same year, dominated by *D. acuta* and *D. caudata* and analyzed by the same LC/MS method as that used for this study yielded OA and DTX2 in a concentration higher than that of PTX2 (Fig. 7). The same analytical conditions allowed the detection of OA in a net-haul sample rich on *D. acuminata* (Fig. 8) (Fernández et al., 2003). Although the detector conditions were

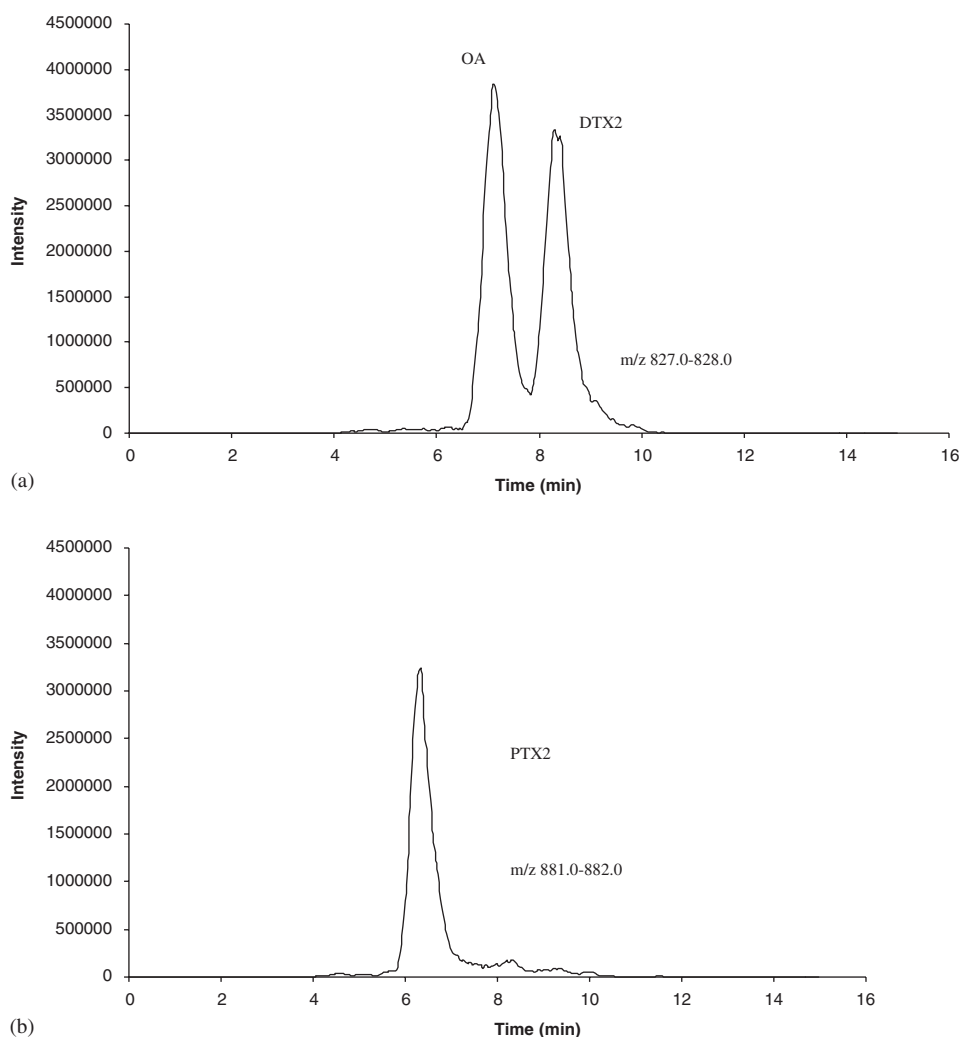


Fig. 7. LC–MS chromatograms of a 1997 net-haul sample dominated by *D. acuta* and *D. caudata* collected at Ria de Vigo: (a) Extracted ion mass chromatograms (m/z 827.0–828.0) (OA and DTX2); (b) Extracted LC–MS ion mass chromatogram (m/z 881.0–882.0) (PTX2).

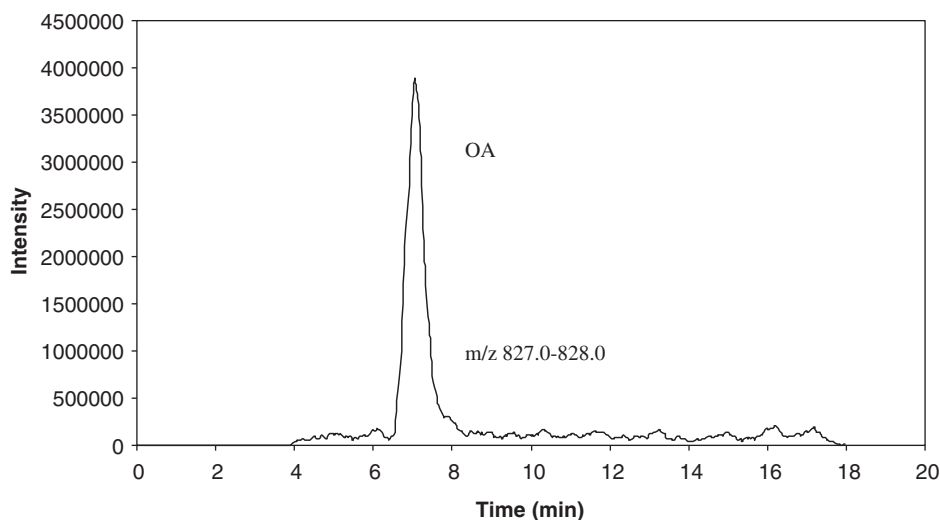


Fig. 8. LC–MS chromatogram of a 1991 net-haul sample of *Dinophysis* cells rich in *D. acuminata* collected at Ria de Vigo : extracted ion mass chromatogram (m/z 827.0–828.0) (OA and DTX2).

optimized for PTX2, these results demonstrate the ability of our system to detect okadaiates. If OA and DTX2 detected in the samples from 1997 resulted from the hydrolysis of esterified forms, these compounds would not have been detected if the samples had been subjected to enzymatic inhibition. This may explain the absence of okadaiates in net-hauls rich in *D. acuta* and *D. caudata*, (Fernández et al., 2003), and in picked cells of *D. acuta* (this study) from the same place and season but from a different year, that were all subjected to enzymatic inhibition.

Furthermore, Portuguese results also from the autumn of 2001 showed that in a hydrolyzed plankton net-haul from Aveiro Lagoon (about 200 km south of the Galician Rías) rich in *D. acuta* (83% of *Dinophysis* spp), but also containing *D. acuminata* (17%), pectenotoxins (69% of PTX2, 7% of PTX2SA) were the dominant toxins. OA and DTX2 represented 16% and 8%, respectively of the total toxin content. *D. acuminata* outbreaks in Northern Portugal are associated with OA in mussels, and the occurrence of DTX2 and pectenotoxins is always related to the occurrence of *D. acuta*, and to a minor extent, of *D. fortii* (Vale and Sampayo, 2002). Therefore, if we removed the OA contribution from *D. acuminata* in that sample, and assumed that the OA:DTX2 ratio in *D. acuta* from Portugal were the same as in the Galician specimens, it would turn out that the amount of PTX2+PTX2SA in the *D. acuta* dominated net-

hauls was almost 8 times higher than the amount of okadaiates. An even higher dominance (12.7–17.5 higher) of pectenotoxins over okadaiates has been found in New Zealand concentrates rich in *D. acuta* (MacKenzie et al., 2005). These authors found that a relatively large amount of the OA in *D. acuta* was released only after alkaline hydrolysis of the extracts, a fact that agrees with the undetectable levels of okadaiates in net-hauls and cells that went through enzymatic inhibition.

In contrast, LC–MS analyses of net-hauls rich in *D. acuta* from Ireland showed a quite constant average proportion of $53 \pm 5\%$ of DTX2, and $26.5 \pm 2.3\%$ of OA, i.e. an OA:DTX2 ratio of 1:2, and PTXs represented $20.8 \pm 4.7\%$, but the proportions between different pectenotoxins were quite variable (Fernández-Puente et al., 2004).

Curiously enough, *D. acuta* specimen from Iberian waters, Ireland and Norway share a very similar morphotype and are clearly distinguishable from the New Zealand and Chilean morphotypes. Nevertheless, the Iberian and Irish morphotypes have the same toxins but in quite different proportions, the Norwegian specimen have DTX1 instead of DTX2 (Johansson et al., 1996), and the proportions between PTXs and okadaiates are most similar between the Iberian and the New Zealand *D. acuta* specimen.

Another surprising point arises when the high PTX2 content of picked *D. caudata* and *D. acuta* cells ($30\text{--}130\text{ pg PTX2 cell}^{-1}$) is compared with the

average content of toxin per cell of *Dinophysis* ($2.5 \text{ pg PTX2 cell}^{-1}$) estimated from analyses of net-haul samples during the same season in October 2001. This decrease in the signal may be explained by matrix effects on the LC–MS response due to influences of coextractives on the electrospray ionization of the analytes. Large differences in toxin content per cell between picked cells and average estimates per cell of *Dinophysis* in net-haul samples have been already reported by the same authors (Blanco et al. 1995, Fernández et al. 2001).

In any case, and considering that extra-cellular enzymatic activity can induce considerable changes in toxin profiles, extreme care should be taken during dinoflagellate cell handling to obtain accurate information on their toxin composition. In the light of current knowledge, previous results on toxin profiles of *Dinophysis* spp. should be reviewed and accepted with caution. Recovery experiments should be undertaken, when analyses with these kind of matrices are performed, to reduce uncertainties in the data.

Our results show that PTX2 can be a major component of the lipophilic-toxin-complex-profile in Galician phytoplankton populations in the autumn when *D. acuta* and *D. caudata* are the dominant *Dinophysis* spp. and diatoms are practically absent. But in mussels exposed to these autumn populations, PTX2SA was found to be the dominant pectenotoxin, and PTX2 levels were considerably lower than those of their seco-acid derivatives (Fernández et al., 2003). Similar results were found in Portuguese shellfish exposed to the same species of *Dinophysis* (Vale and Sampayo, 2002). This is in agreement with previous reports that support the conclusion that PTX2 is converted to PTX2SA after enzymatic oxidation in shellfish tissues (Suzuki et al., 2001). Therefore, PTX2 can be a major component of the lipophilic-toxin-complex-profile in phytoplankton and PTX2SA the principal PTX of the toxin complex in shellfish of the Galician Rías exposed to autumn proliferations of *D. acuta* and *D. caudata*. The production of these toxins by other *Dinophysis* spp. from the region, such as *D. tripos* and *D. rotundata*, present in lower concentrations, or even by *D. acuminata*, despite the fact that PTXs were not found in the few samples so far analyzed, that contained only this species of *Dinophysis*, can not be discarded.

These results have important implications for phycotoxin monitoring programmes. Decision 2002/225/EC (Anonymous, 2002) regulates a max-

imum level for OA derivatives and pectenotoxins together of $160 \mu\text{g eq. OA kg}^{-1}$ edible part, and establishes that if chemical methods are used, PTX1 and PTX2 should be monitored. PTX2SA is not mentioned in the European Directive, that states that “if new toxin analogues of public health significance are discovered, they should be included in the regulation analyses” (Anonymous, 2002). Human toxicity data on PTX2SA is still scarce and uncertain. High levels of PTX2SA found in Australian “pipis” (*Donax deltoides*) in 1997 were suspected to be the cause of a severe human DSP intoxication (Burgess and Shaw, 2001), but later studies showed that the samples that caused this toxic outbreak were contaminated with esters of okadaic acid, and the latter were considered to be responsible for the gastrointestinal damage observed in mice (Burgess and Shaw, 2003).

Recent studies by Miles et al. (2004) confirmed the toxicity of PTX2 to mice, given by intraperitoneal injection, but previously reported toxicity after oral administration (Ogino et al., 1997) was not confirmed. The same authors suggested that their results possibly reflected a poor absorption of PTX2 in the gastrointestinal tract, or its conversion into a less toxic compound, such as PTX2SA; in the guts. PTX2SA was of low toxicity to mice, both orally and intraperitoneally, and neither PTX2 nor its secoacid derivatives had diarrhetic effects. These results led Miles et al. (2004) to conclude that the severe diarrhea in mice attributed to PTX2 by Ishige et al. (1998) was a result of contamination of the samples with okadaic acid derivatives. Uncertainties of this kind, on the toxic effects of different lipophilic toxins in mammals, may have been more frequent than reported, as now we know pectenotoxins and okadaic acid derivatives have a common source, i.e. dinoflagellate cells of the genus *Dinophysis*, and are likely to co-occur in shellfish exposed to blooms of these microalgae.

In relation with control methods, if mouse bioassay based on intraperitoneal injection is the standard procedure in use for regulation of lipophilic toxins, injection of shellfish extract gives a non-specific result for the combination of okadaic acids and pectenotoxins, and PTX2SA is not detected (Daiguji et al., 1998). Considering that regulations on pectenotoxins may be modified in the future, when more toxicological data become available, it would be desirable to complement the mouse bioassay methods or even substitute them, if possible, to distinguish in a reliable manner the

different groups of lipophilic toxins that have quite different effects on human health.

Finally, results presented here show once more that toxin content of the same dinoflagellate species can vary considerably even within specimens collected in the same locality. Authors from New Zealand (MacKenzie et al., 2005) and Ireland (Fernández-Puente et al., 2004) claimed that toxin profiles of the same species in the same locality were very stable, and that toxin content varied within narrow limits. But in our opinion, these conclusions have been reached on the basis of very limited numbers of samples, most of them collected at the time of the species annual peak in cell density. It is necessary to carry out more systematic studies on the toxin profiles and toxin contents of each species of *Dinophysis* throughout the whole growth season of the species. This task, that is one of our present objectives, is perfectly attainable with the latest technological advances that allow analyses of very small samples (composed of a few cells), by liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

Acknowledgements

We thank Patricia Lourés for technical assistance, the crew of R.V. “José M. Navaz” for continuous help in collecting samples and the Instituto Tecnológico del Mar (INTECMAR, Xunta de Galicia) for weekly information on phytoplankton monitoring data. This research was funded by Spanish National Projects MAR98-0978 and REN2002-02486.

References

- Anonymous, 2002. Commission Decision 2002/225/EC from 15 March 2002, laying down detailed regulations for the application of Council Directive 91/492/EEC. Off. J. Eur. Communities L 075, 62–64.
- Anonymous, 2004. Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs, Oslo, Norway, September 26–30, 2004, 31pp.
- Arévalo, F., Valcárcel, J.A., Domonte, M., Vázquez, M.J., 1994. Estudio comparativo de los resultados obtenidos por bioensayo y HPLC en la determinación de biotoxinas DSP. Datos preliminares. In: Mariño, J., Maneiro, J. (Eds.), Actas de la III Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas, Ediciones de la Consellería de Pesca Marisqueo e Acuicultura. Xunta de Galicia, pp. 89–93.
- Arévalo, F., Bermúdez de la Puente, M., Domonte, M., Pérez, M., Salgado, C., Vázquez, M.J., Valcárcel, J.A., 1995. Biotoxinas PSP y DSP en las Rías Gallegas: Control y evolución durante los años 1993 y 1994. In: Matamoros, E., Delgado, M. (Eds.), IV Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Actas de la Reunión. Generalitat de Catalunya, Barcelona, pp. 39–51.
- Blanco, J., Fernández, M.L., Mariño, J., Reguera, B., Míguez, A., Maneiro, J., Cacho, E., Martínez, A., 1995. From *Dinophysis* spp toxicity to DSP outbreaks: a preliminary model of toxin accumulation in mussels. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., Marcaillou-Le Baut, C. (Eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, Paris, pp. 777–782.
- Blanco, J., Morono, A., Pazos, Y., Maneiro, J., Mariño, J., 1998. Trends and variations of the abundance of main PSP and DSP producing species in the Galician Rías: environmental and biological influences. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, New York, pp. 204–207.
- Burgess, V., Shaw, G., 2001. Pectenotoxins—an issue for public health. A review of their comparative toxicology and metabolism. Environ. Int. 27, 275–283.
- Burgess, V., Shaw, G., 2003. Investigations into the toxicology of pectenotoxin-2-seco acid and 7-epi pectenotoxin 2-seco acid to aid in a health risk assessment for the consumption of shellfish contaminated with these shellfish toxins in Australia. Report of Project No. 2001/258. National Research Centre for Environmental Toxicology, Archerfield, Queensland, Australia, 50pp.
- Daiguji, M., Satake, M., James, K.J., Bishop, A., MacKenzie, L., Naoki, H., Yasumoto, T., 1998. Structures of new pectenotoxin analogs, pectenotoxin-2 seco acid and 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid, isolated from a dinoflagellate and greenshell mussels. Chem. Lett. 7, 653–654.
- Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria, P., Poletti, R., 1996. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. Toxicon 34, 923–935.
- Eaglesham, G.K., Brett, S.J., Davis, B.C., Holling, N., 2000. Detection of Pectenotoxins-2 and Pectenotoxins-2 Seco Acid in phytoplankton and shellfish from the Ballina region of New South Wales, Australia. In: Abstracts from the X International IUPAC symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Brazil, May 2000, p. 40.
- Fernández, M.L., Reguera, B., Ramilo, I., Martínez, A., 2001. Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from the Galician Rías Bajas. In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (Eds.), Harmful Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 360–363.
- Fernández, M.L., Míguez, A., Morono, A., Arévalo, F., Pazos, Y., Salgado, C., Correa, J., Blanco, J., González-Gil, S., Reguera, B., 2003. First report of pectenotoxin-2 in phytoplankton net-hauls and mussels from the Galician Rías Baixas during proliferations of *Dinophysis acuta* and *D. caudata*. In: Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J., Beiras, R. (Eds.), Molluscan Shellfish Safety. Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Santiago de Compostela, Spain, pp. 75–83.
- Fernández-Puente, P., Fidalgo-Sáez, M.J., Hamilton, B., Furey, A., James, K.J., 2004. Studies of polyether toxins in the marine phytoplankton, *Dinophysis acuta*, in Ireland using multiple tandem mass spectrometry. Toxicon 44, 919–926.

- Flores, M., Franco, J.M., Lluch-Cota, S.E., Lluch-Cota, D.B., Cortés-Altamirano, R., Sierra-Beltrán, A.P., 2002. Recent species shifts on the HAB occurrences in Acapulco Bay, Mexico. Abstracts of the Xth International Conference on Harmful Algae, St Pete Beach, FL, p. 96.
- Fukuyo, Y., Takano, H., Chihara, M., Matsuoaka, K., 1990. Red Tide Organisms in Japan—An Illustrated Taxonomic Guide. Uchida Rokakuho, Tokyo, 430pp.
- Gago, A., Rodríguez-Vázquez, J.A., Thibault, P., Quilliam, M., 1996. Simultaneous occurrence of diarrhetic and paralytic shellfish poisoning toxins in Spanish mussels in 1993. *Nat. Toxins* 4, 72–79.
- Guzmán, L., Campodonico, I., 1975. Marea roja en la Región de Magallanes. *Publ. Inst. Pat. Ser. Mon.* 9, 44.
- Holmes, M.J., Teo, S.L.M., 2002. Toxic marine dinoflagellates in Singapore waters that cause seafood poisonings. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 829–836.
- Hu, T., Doyle, J., Jackson, D., Marr, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 1992. Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from Irish mussels. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 39–41.
- James, K.J., Bishop, A.G., Gillman, M., Kelly, S.S., Roden, C., Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria, P., 1997. Liquid chromatography with fluorimetric, mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection for investigation of the sea-food toxin producing phytoplankton *Dinophysis acuta*. *J. Chromatogr. A* 777, 213–221.
- James, K.J., Bishop, A.G., Draisci, R., Palleschi, L., Marchiafava, C., Ferretti, E., Satake, M., Yasumoto, T., 1999a. Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish. *J. Chromatogr. A* 844, 53–65.
- James, K.J., Bishop, A.G., Healy, B.M., Roden, C., Sherlock, I.R., Twohig, M., Draisci, R., Giannetti, L., Lucentini, L., 1999b. Efficient isolation of the rare diarrhoeic shellfish toxin, Dinophysistoxin-2, from marine phytoplankton. *Toxicon* 37 (2), 343–357.
- Johansson, N., Granéli, E., Yasumoto, T., Carlsson, P., Legrand, C., 1996. Toxin production by *Dinophysis acuminata* and *D. acuta* cells grown under nutrient sufficient and deficient conditions. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 277–280.
- Karunasagar, I., Segar, K., Karunasagar, I., 1989. Potentially toxic dinoflagellates in shellfish harvesting areas along the coast of Karnataka State (India). In: Okaichi, T., Anderson, D.M., Nemoto, T. (Eds.), Red Tide: Biology, Environmental Science, and Toxicology. Elsevier, New York, pp. 65–68.
- Lee, J.-S., Yanagi, T., Kenma, R., Yasumoto, T., 1987. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.* 51, 877–881.
- Lembeye, G., Yasumoto, T., Zhao, J., Fernández, R., 1993. DSP outbreak in Chilean fiords. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 525–529.
- MacKenzie, L., Truman, P., Satake, M., Yasumoto, T., Adamson, J., Mountfort, D., White, D., 1998. Dinoflagellate blooms and associated DSP toxicity in shellfish in New Zealand. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 74–77.
- MacKenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., Suzuki, T., Selwood, A., 2005. Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* from New Zealand. *Harmful Algae* 4, 75–85.
- Marasigan, A.N., Sato, S., Fukuyo, Y., Kodama, M., 2001. Accumulation of a high level of diarrhetic shellfish toxins in the green mussel *Perna viridis* during a bloom of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis miles* in Sapián Bay, Panay Island, the Philippines. *Fish. Sci.* 67, 994–996.
- McMahon, T., Silke, J., 1998. Algal blooms and shellfish toxicity in Irish Coastal Waters. In: Wilson, J.G. (Ed.), Eutrophication in Irish Coastal Waters. Royal Irish Academy, Dublin, pp. 106–114.
- Méndez, S., Ferrari, G., 2002. Floraciones algales nocivas en Uruguay: Antecedentes, proyectos en curso y revisión de resultados. In: Sar, E.A., Ferrario, M.E., Reguera, B. (Eds.), Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano. Instituto Español de Oceanografía, Madrid, pp. 269–288.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Munday, R., Dines, M.H., Hawkes, A.D., Briggs, L.R., Sandvik, M., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Holland, P.T., Quilliam, M.A., MacKenzie, A.L., Beuzenberg, V., Towers, N.R., 2004. Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. *Toxicon* 43 (1), 1–9.
- Murata, M., Masaki, S., Iwashita, T., Naoki, H., Yasumoto, T., 1986. The structure of pectenotoxin-3, a new constituent of diarrhetic shellfish toxins. *Agric. Biol. Chem.* 50, 2693–2695.
- Ofuji, K., Satake, M., Oshima, Y., McMahon, T., James, K.J., Yasumoto, T., 1999. A sensitive and specific determination method for azaspiracids by Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Nat. Toxins* 7, 247–250.
- Ogino, H., Kumagai, M., Yasumoto, T., 1997. Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Nat. Toxins* 5 (6), 255–259.
- Okaichi, T., 1967. Red tides found in and around the Seto Inland Sea in 1965. *Tech. Bull. Fac. Agric. Kagawa Univ.* 15, 181–185.
- Poletti, R., Cettul, K., Bovo, F., Milandri, A., Pompei, M., Frate, R., 1998. Distribution of toxic dinoflagellates and their impact on shellfish along the northwest Adriatic coast. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Comisión of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 88–90.
- Quilliam, M.A., Hardstaff, W.R., Ishida, N., McLachlan, J.L., Reeves, A.R., Ross, N.W., Windust, A.J., 1996. Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 289–292.
- Reguera, B., Bravo, I., Fraga, S., 1990. Distribution of *Dinophysis acuta* at the time of a DSP outbreak in the rías of Pontevedra and Vigo (Galicia, NW Spain). International Council for the Exploration of the Sea, C.M. 1990/L:14, 8.
- Reguera, B., Bravo, I., Marcaillou-Le Baut, C., Masselin, P., Fernández, M.L., Míguez, A., Martínez, A., 1993. Monitoring of *Dinophysis* spp and vertical distribution of okadaic acid on mussel rafts from Ría de Pontevedra (NW Spain). In:

- Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 553–555.
- Rodríguez-Vázquez, J.A., Gago, A., Oshima, Y., Sugino, K., Lee, J.S., Yasumoto, T., 1989. Analyses of toxins in mussels from the Atlantic coast of Spain. In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. (Eds.), Mycotoxins and Phycotoxins'88. Elsevier, Amsterdam, pp. 367–375.
- Sampayo, M.A.M., Alvito, P., Franca, S., Sousa, I., 1990. *Dinophysis* spp. toxicity and relation to accompanying species. In: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L., Anderson, D.M. (Eds.), Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier, New York, pp. 215–220.
- Santhanam, R., Srinivasan, A., 1996. Impact of dinoflagellate *Dinophysis caudata* bloom on the hydrography and fishery potentials of Tuticorin Bay, South India. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 41–44.
- Suzuki, T., Mitsuya, T., Matsubara, H., Yamasaki, M., 1998. Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate *Dinophysis fortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection. Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallop. J. Chromatogr. A. 815, 155–160.
- Suzuki, T., MacKenzie, L., Stirling, D., Adamson, J., 2001. Pectenotoxin-2 seco acid: a toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand Greenshell mussels, *Perna canaliculus*. Toxicon 39, 507–514.
- Tahri-Joutei, L., 1998. *Gymnodinium catenatum* Graham blooms on Moroccan waters. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 66–67.
- Tseng, C.K., Zhou, M.J., Zou, J.Z., 1993. Toxic phytoplankton studies in China. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 347–352.
- Vale, P., Sampayo, M.A., 1996. DTX-2 in Portuguese shellfish. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 539–542.
- Vale, P., Sampayo, M.A.M., 2000. Dinophysistoxin-2: a rare diarrhoeic toxin associated with *Dinophysis acuta*. Toxicon 38, 1599–1606.
- Vale, P., Sampayo, M.A.M., 2002. Pectenotoxin-2 seco acid, 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid and pectenotoxin-2 in shellfish and plankton from Portugal. Toxicon 40, 979–987.
- Vershinn, A., Kamnev, A., 2001. Harmful algae in Russian European coastal waters. In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (Eds.), Harmful Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 112–114.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Matsumoto, G.K., Clardy, J., 1984. Diarrhetic shellfish poisoning. In: Ragelis, E.P. (Ed.), Seafood Toxins. American Chemical Society, Symposium Series No. 262, Washington, DC, pp. 207–216.

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ARTÍCULO 1: “From *Dinophysis* spp toxicity to DSP outbreaks: a preliminary model of toxin accumulation in mussels.”

En el trabajo que se muestra en el artículo 1 se analizaron mediante HPLC-FD arrastres multiespecíficos de la Ría de Pontevedra ricos en *Dinophysis* y se estimaron, mediante un análisis de regresión múltiple, los contenidos de ácido okadaico y análogos de las diferentes especies de *Dinophysis* presentes en dichos arrastres por medio de la relación entre la abundancia de las mismas en el plancton y las concentraciones detectadas de dichas toxinas. Asimismo, se desarrolló un modelo preliminar de acumulación de toxinas en los mejillones para predecir el impacto de *Dinophysis* en la toxicidad de los mismos. El modelo se basó en los principales parámetros de la fisiología nutricional de los mejillones, simulando el potencial tóxico como una función de las células tóxicas, de la materia particulada (seston) en el mar y de las tasas de filtración y detoxificación.

Resultados y discusión:

Los resultados del análisis cromatográfico mostraron que el ácido okadaico fue la toxina predominante en la mayoría de las muestras. En más de la mitad de los arrastres fitoplanctónicos se observó un segundo pico próximo al correspondiente al AO, que se asignó a la dinophysistoxina 2 (DTX2) - previamente identificada en mejillón irlandés- al comprobarse que presentaba un comportamiento cromatográfico idéntico al encontrado en los extractos del citado mejillón de Irlanda. No se detectó DTX1 en ninguno de los arrastres.

Dinophysis acuta y *D. acuminata* estaban presentes en todas las muestras en las que apareció el ácido okadaico y el pico asignable a la DTX2. La especial relación entre *D. acuta* y esta última toxina se hizo evidente durante una proliferación inusual de esta especie en diciembre de 1992, sugiriendo que *D. acuta* es la principal productora de DTX2 en el área y que puede alcanzar concentraciones considerables en el plancton.

Los trabajos realizados hasta la fecha en relación a la toxicidad DSP de los mejillones y de las células de *Dinophysis* de las Rías Gallegas habían confirmado la presencia de AO (Kumagai *et al.* 1986, Rodríguez Vázquez *et al.*, 1989, Gago *et al.*, 1993, Lee *et al.*, 1989a). Sin embargo, los resultados de este trabajo muestran la prácticamente segura presencia en *Dinophysis* de una segunda toxina, la DTX2. Adicionalmente se mostró que la DTX1, frecuentemente asociada a *Dinophysis* en otras áreas (Dahl and Yndestad, 1985; Dahl *et al.*,

1995; Lee *et al.*, 1989a; Suzuki *et al.*, 1997, Tangen *et al.*, 1983; Krogh *et al.*, 1985), no lo está en Galicia y que su presencia en el plancton resulta despreciable.

En las muestras en las que únicamente *D. acuminata* y el AO estaban presentes, se estimó un máximo de contenido en toxina de 7.2 pg cel⁻¹. Los resultados del análisis de regresión múltiple mostraron a *D. acuminata*, *D. acuta* y *D. rotundata* como los principales agentes productores de toxinas DSP, en tanto que no se obtuvo correlación entre la presencia de AO y DTX2 con la presencia de *D. caudata* y *D. sacculus* en el plancton.

La estimación del contenido medio de AO por célula de *D. acuminata*, 6 pg AO cel⁻¹, fue próximo al obtenido por Lee *et al.* (1989) con células obtenidas por micromanipulación. En el caso de *D. acuta*, se estimaron dos valores mucho más altos que los documentados previamente (Lee *et al.*, 1989 a) en células correspondientes a una ocurrencia inusual de esta especie en diciembre. Estos valores podrían explicarse considerando que esta proliferación fuera debida a una introducción tardía de aguas de la plataforma en las rías (fenómeno común a principios de otoño), y suponiendo que esta población tardía de *D. acuta* estuviera formada por células adultas de crecimiento lento, en el último periodo de la fase exponencial o ya en fase estacionaria, fases en las que para las que en el caso de *Prorocentrum lima*, otra especie de dinoflagelado productora de toxinas DSP se han documentado los contenidos máximos de toxinas.

Los resultados obtenidos para *D. rotundata* difieren de los encontrados por Cembella *et al.* (1989) y Masselin *et al.* (1992) que consideraron esta especie como no tóxica y de los de Lee *et al.*, (1989) que, en contraste, mostraron un contenido de 101 pg cel⁻¹ de DTX1 para esta especie.

La acumulación de toxicidad puede predecirse adecuadamente por medio de un modelo sencillo de acumulación que utiliza como entradas la concentración de células de *Dinophysis* en el mar y el contenido en toxinas de sus células. La concordancia entre los cierres del mercado reales y los obtenidos a partir del modelo fue buena cuando se utilizó la concentración de *Dinophysis* en el agua y el valor medio de contenido de toxinas obtenido a partir del análisis de regresión, aunque, sorprendentemente, resultó más pobre cuando se utilizó el contenido en toxinas por célula obtenida del análisis por HPLC de las muestras de los arrastres.

Si bien el comportamiento y la eficiencia nutricional de los mejillones parecen estar afectados por varias variables medioambientales, entre las que la concentración y el contenido en materia orgánica del seston son consideradas las más importante (Bayne *et al.*, 1983; 1987), el modelo preliminar presentado en este trabajo, a pesar de su simplificación, encaja

razonablemente bien con los datos reales. Éste es el primer modelo de acumulación de toxinas DSP y apoya la idea de que la incorporación de parámetros fisiológicos de los bivalvos es esencial a la hora de predecir y modelar el impacto del fitoplancton tóxico en la toxicidad de los mismos.

ARTICULO 2: “Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from the Galician Rías Bajas”.

En este artículo se presentan los resultados relativos al perfil y contenido de toxinas por célula de *D. acuminata*, *D. acuta* y *D. caudata* aisladas por micromanipulación a partir de arrastres de red de poblaciones naturales fitoplanctónicas multiespecíficas recogidas durante episodios de DSP en las Rías de Pontevedra y Vigo en la primavera y otoño de 1997 y 1998. Adicionalmente, en las muestras de *D. acuminata* de junio de 1998, se realizaron estudios preliminares para la estimación indirecta de los diol ésteres y DTX4 en células aisladas individualmente, calculando la diferencia de niveles de AO entre células sometidas a un proceso de inactivación enzimática y células de la misma población en las que sí se permitió la hidrólisis.

Resultados y discusión:

Se detectó AO en todas las muestras de *Dinophysis acuminata*. En las muestras de junio de 1998, sometidas a dos tipos de extracción, no se observaron diferencias significativas en los resultados que pudieran indicar la presencia mayoritaria de formas conjugadas del AO en las células analizadas (9.9 pg cel⁻¹ en la muestra sometida a hidrólisis enzimática y 7.9 pg cel⁻¹ en la muestra en la que se evitaron transformaciones enzimáticas). Se observa un minúsculo pico con un tiempo de retención similar al de la DTX2.

En lo que respecta a *Dinophysis acuta*, se detectó AO y DTX2 en las tres muestras analizadas. En las dos primeras muestras la proporción AO: DTX2 fue aproximadamente 3:2.

En el caso de *Dinophysis caudata*, se observó en el cromatograma un pico muy pequeño con el mismo tiempo de retención que el AO que podría interpretarse como trazas de AO (~ 0.7 pg cel⁻¹).

En estos resultados preliminares se establece y confirma por primera vez la presencia de DTX2 en *D. acuta* de las Rías Bajas Gallegas, ya observada en los trabajos mostrados en el artículo 1 (Blanco *et al.*, 1995), en los que se detectaron picos con comportamiento cromatográfico idéntico a la DTX2 en los análisis de arrastres fitoplanctónicos que sugirieron que la aparición de este compuesto estaba asociada con la ocurrencia de *D. acuta*.

Posteriormente, Gago *et al.* (1996) y Vale y Sampayo (1996) confirmaron la presencia de DTX2 en mejillón de Galicia y Portugal respectivamente. Asimismo, Vale y Sampayo (1998) correlacionaron la aparición de DTX2 en bivalvos portugueses con la ocurrencia de *D. acuta*. James *et al.* (1998) identificaron mediante HPLC-MS que la DTX2 es la toxina predominante en *D. acuta* en Irlanda en una proporción de AO: DTX2 de aproximadamente 3:2 que, curiosamente, coincidía con la observada por Blanco *et al.* (1995) en los análisis de arrastres de poblaciones naturales multiespecíficas entre las que se incluía *D. acuta*. De igual forma, los resultados obtenidos en este trabajo confirmaron las estimaciones previas de Blanco *et al.* (1995) en relación a que la DTX2 puede constituir hasta un 40% del total de toxinas.

Todo lo anterior no tiene trascendencia en lo que respecta al control sanitario realizado mediante bioensayo en ratón, que estima el efecto biológico del conjunto de toxinas diarreicas, pero si podría tenerla en el caso de la utilización de métodos alternativos que no fueran muy sensibles a la detección de esta toxina.

La presencia de cantidades traza de AO en una única muestra analizada de *D. caudata* de septiembre de 1997, sugiere su capacidad para biosintetizar toxinas aunque al tratarse de una sola muestra se requiere confirmación de este resultado en futuros análisis. No obstante, en el trabajo que se muestra en el artículo 1 (Blanco *et al.*, 1995) en el que se aplicó análisis de regresión múltiple a los resultados de concentración de toxinas de arrastres fitoplanctónicos se sugiere ya que esta especie, debía contribuir poco o nada a la toxicidad global obtenida.

El contenido de toxinas por célula parece estar influenciado tanto por la cepa que desarrolla mayoritariamente el episodio como por las condiciones en las que se encuentran las células en la proliferación. En relación con el primer aspecto, cabe destacar que, en *Dinophysis acuminata*, las muestras de septiembre presentan un contenido celular en toxinas dos veces superior a la de junio (21.7 pg cel⁻¹). En relación con el segundo aspecto, se observó que *Dinophysis acuta* presentó importantes diferencias cuantitativas entre las muestras de arrastres mantenidos en el laboratorio 5 y 9 días (55.1 y 24.1 pg cel⁻¹) y la muestras resultantes de los aislamientos de células realizados el mismo día de recogida del arrastre (10.7 pg cel⁻¹). El contenido en toxinas de las células aumentó durante 5 días de mantenimiento en el laboratorio, estimándose una tasa de producción de toxina por célula en 0.33 día⁻¹. Tras 7 días, sin embargo, se produjo un descenso. Una posible explicación sería que la tasa de división celular fue muy reducida (quizás por las manipulaciones del arrastre, o debido a condiciones subóptimas en las cámaras de cultivo), mientras que continuaba la síntesis de toxinas DSP. El

descenso de toxina por célula obtenido tras 7 días de mantenimiento artificial revelaría el principio del decaimiento del arrastre.

Los resultados previos sobre la estimación de contenido en toxinas de células de *Dinophysis* spp habían puesto de manifiesto una gran variabilidad en los valores obtenidos para cada especie en distintas zonas del mundo o incluso en la misma localidad (Lee *et al.*, 1989a; Subba Rao *et al.*, 1993; Andersen *et al.*, 1996; Johansson *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1997). Al no disponerse de cultivos de estas especies, resulta difícil determinar si esta variabilidad se debe a que estamos trabajando con cepas distintas de toxicidad muy diversa o si se trata de las mismas cepas respondiendo a distintas condiciones ambientales o poblaciones con distinta tasa de crecimiento y biovolumen. En el caso del complejo *D. acuminata*, el problema se complica por la gran variabilidad morfológica, o plasticidad, que presenta esta especie. Es necesario, pues, obtener repetidas estimaciones de toxicidad por célula en series temporales durante distintas estaciones del año, y relacionar estos valores con el tamaño/forma de las células, y aún mejor, acompañar estos estudios de otros que determinen la variabilidad genética de las células procedentes de distintos episodios.

ARTICULO 3: “Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain)”.

El objetivo de los trabajos mostrados en el artículo 3 fue conocer el contenido y el perfil de toxinas DSP de diferentes cepas de *Prorocentrum lima* de las Rías Gallegas, así como elucidar su contribución a los episodios de toxicidad DSP en los moluscos. Para ello se realizó el análisis por HPLC-FD de la composición de toxinas DSP de 19 cepas de *Prorocentrum lima* obtenidas en diferentes localizaciones en las Rías Gallegas (Vigo y Pontevedra). El procedimiento de ebullición/congelación/ descongelación /hidrólisis que permite la detección de AO, DTX1 y DTX2 y la determinación indirecta de sus derivados esterificados fue aplicado durante la extracción de las toxinas.

Resultados y discusión:

Todas las cepas analizadas contenían AO y DTX1, con la excepción de una de ellas, en la que no se detectó DTX1 en cantidades apreciables.

Con respecto a las toxinas carboxílicas (AO, DTX1 y DTX2) los valores más altos fueron 12.9 pg AO cel⁻¹ y 12.4 pg DTX1 cel⁻¹. La DTX2 fue detectada en cantidades considerablemente menores en 13 cepas, siendo 1.14 pg cel⁻¹ el máximo valor.

La aplicación de los dos procedimientos de extracción, con y sin hidrólisis enzimática reveló la presencia de AO y DTX2 en forma esterificada en la mayor parte de las cepas de *P. lima*. La DTX1 no fue detectada en forma esterificada en ninguna de las cepas. El AO esterificado alcanzó valores de hasta 17.5 pg cel⁻¹ expresados como pg de equivalentes de AO libre. Se detectaron ésteres de DTX2 en 15 cepas, alcanzándose valores de hasta 1.6 pg cel⁻¹ expresados como pg de equivalentes de DTX2 libre. La composición de toxinas varió claramente dependiendo de la cepa en cuestión así como la producción total de toxina que varió entre 2 pg cel⁻¹ y 28.6 pg cel⁻¹. Además de los picos con tiempos de retención coincidentes con los de AO, DTX1 y DTX2, se encontraron varios picos próximos, algunos de los cuales aumentaron su área tras la hidrólisis enzimática, indicando la posibilidad de otros análogos del AO presentes en forma carboxílica y en forma esterificada.

El análisis de cluster llevado a cabo usando los porcentajes de todas las toxinas encontradas en las 19 cepas las situó en 4 grupos distintos dependiendo de su composición de toxinas. El grupo más claramente diferenciado es el que se separa en primer lugar. Las cepas incluidas en este cluster fueron todas aisladas de la laguna de las Islas Cíes. El análisis ANOVA mostró diferencias entre el perfil de toxinas de los cuatro grupos para al menos dos de las principales toxinas. Para los clusters 1 y 3 la proporción intracelular de AO en forma libre fue bastante similar a aquella en forma esterificada, y lo mismo puede decirse de DTX2 y su forma esterificada. La DTX1 fue claramente la toxina predominante en el grupo 3, mientras que el AO esterificado fue la toxina dominante en el grupo 2. Para el cluster 4, no se observaron diferencias significativas en el contenido de las tres principales toxinas.

La composición de toxinas no varió apreciablemente durante el crecimiento de las cepas y en su lugar se observó un incremento en la concentración por célula de todos los componentes durante el crecimiento.

El procedimiento de congelación/descongelación/hidrólisis, que promueve la conversión de las toxinas esterificadas a AO, DTX1 o DTX2, aunque no discrimina entre diol ésteres y compuestos del tipo DTX4 permite la valoración de la contribución de estos derivados a la toxicidad total DSP. La aplicación de este procedimiento está claramente indicada para la valoración de la toxicidad potencial de los dinoflagelados, especialmente teniendo en cuenta la importante contribución de los derivados esterificados a la toxicidad total.

AO, DTX1 y DTX2 son potentes inhibidores de las proteínas fosfatasa PP1 y PP2A (Haystead *et al.*, 1989) habiéndose sugerido que estas sustancias ejercen un efecto alelopático

en el crecimiento de otras microalgas (Windust *et al.*, 1996). Hu *et al.* (1995) han sugerido que el almacenamiento intracelular de las toxinas en forma de sulfatos, menos activos, podría ser un mecanismo de auto-protección para las células productoras de DSP, e incluso un medio de excretar las toxinas carboxílicas desde la célula al medio acuoso. Sin embargo, de los resultados obtenidos en este estudio no parece claro que exista un patrón común de almacenamiento de las toxinas DSP en el interior de las células. En efecto, aunque para algunas de las cepas las formas esterificadas fueron claramente dominantes (cluster 2), para otras lo fueron las formas carboxílicas (ej: DTX1 en cluster 3). Este hipotético mecanismo de autoprotección no parece ser aplicable al caso de la DTX1 que, aunque es ligeramente más tóxica que el AO, no fue detectada en forma esterificada en cantidades significativas en nuestro experimento.

La variabilidad en la producción de toxinas de diferentes cepas de *P. lima* ha sido mostrada en varios estudios. De los resultados de nuestro estudio, es digna de mención la diferenciación observada a través del análisis de cluster de las cepas correspondientes a la laguna de las Islas Cíes. Todas las cepas de esta área fueron separadas hacia un grupo distinto en función de la composición de toxinas (cluster 1 en figura 4), mientras que los otros grupos no se separaron en función de localidades definidas. Es importante mencionar que la laguna de las Cíes se caracteriza por su aislamiento geográfico en relación con las rías de Vigo o Pontevedra, y que su conexión con el exterior se orienta hacia el mar abierto, lo que apoyaría la hipótesis de un aislamiento de las poblaciones en esa área. Este hecho muestra que para analizar los riesgos asociados a esta especie y quizás a otras bentónicas, hay que realizar estudios detallados de la distribución geográfica y de las características de las posibles cepas implicadas.

En relación a la producción de toxinas durante el crecimiento, se observa un progresivo incremento en la toxicidad total por célula. La concentración máxima de toxinas en la fase estacionaria de los cultivos de *P. lima* ha sido también citada en cultivos de especies provenientes de otras regiones (McLachlan *et al.*, 1994; Quilliam *et al.*, 1996; Sechet *et al.*, 1998).

La presencia de *P. lima* en las cuerdas de las bateas donde tiene lugar la producción de mejillón en Galicia, así como el conocimiento de que esta especie era productora de toxinas DSP llevó en un primer momento a asociar esta especie con la aparición de toxinas DSP en moluscos de las rías gallegas. Sin embargo, los conocimientos actuales sobre las toxinas

producidas por las especies del género *Dinophysis* presentes en el área (Blanco *et al.*, 1995, Fernández *et al.*, 2001), junto con la buena correlación entre la ocurrencia de estas especies y los episodios de DSP claramente indican que *Dinophysis* spp son los principales agentes responsables de los eventos DSP en la región. Además, las principales toxinas encontradas en mejillones de las rías Gallegas en los últimos años son AO, DTX2 y en cantidades relativamente bajas sus correspondientes ésteres mientras que la DTX1, que está presente en la mayoría de las cepas de *P. lima*, no ha sido encontrada en moluscos de esta región (Fernández *et al.*, 1998). Por tanto, en relación a las especies causantes, parece que los episodios de DSP en Galicia no son similares a los de la costa este de Canadá, en los que se sospecha que *P. lima* es el origen de las toxinas DSP encontradas en los mejillones (Jackson *et al.*, 1993, Lawrence *et al.*, 1998).

Al igual que se ha documentado en la costa atlántica de Canadá (Lawrence *et al.*, 2000), las bateas de mejillón de Galicia proporcionan un habitat que favorece la colonización y el crecimiento de macroalgas que soportan comunidades de microorganismos entre los cuales se encuentran epifitos tales como *P. lima*. A partir del estudio de Bravo (1991) se deduce que las poblaciones de *P. lima* en las bateas de las Rías Gallegas están gobernadas por una estacionalidad y una especificidad de sustrato que las hace muy limitadas en el tiempo y en la localización. Por esta razón, si bien la capacidad de estas poblaciones para desprenderse del sustrato e introducirse en el mejillón a través de la cadena trófica es desconocida, no puede descartarse que este hecho pudiera ocurrir en una escala menor que la usada para la detección del fitoplancton en las costas gallegas.

ARTICULO 4: “First report of PTX-2 in phytoplankton net hauls and mussels from the Galician Rías Bajas during proliferations of *Dinophysis acuta* and *D. caudata*”.

El objetivo de los trabajos que se muestran en el artículo 4 fue investigar la presencia de pectenotoxinas, ácido okadaico y derivados en arrastres fitoplanctónicos y en mejillones. Para ello, se analizaron por HPLC-MS muestras de arrastres fitoplanctónicos ricas en *D. acuta*, *D. caudata* y/o *D. acuminata* recogidas en primavera y otoño durante episodios de toxicidad DSP y muestras de mejillón recogidas en una estación de la Ría de Pontevedra en los meses de octubre de 1994 y 1997.

Resultados y discusión:

El AO fue la toxina predominante en un arrastre fitoplanctónico rico en *D. acuminata*, no detectándose la presencia de DTX2 ni de pectenotoxinas. Este resultado es acorde con resultados previos obtenidos por HPLC-FD que mostraron el AO como la principal toxina detectada en células aisladas de *D. acuminata* obtenidas por micromanipulación (Fernández *et al.*, 2001) y en arrastres fitoplanctónicos en los que *D. acuminata* fue la especie dominante (Moroño *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos con los arrastres fitoplanctónicos de principios de otoño (septiembre-octubre) ricos en *D. acuta*, *D. caudata* y *D. tripos* mostraron que la PTX2 puede estar presente en concentraciones similares al AO y derivados o incluso ser la toxina mayoritaria. Los resultados correspondientes a uno de los arrastres obtenido en octubre de 1997 en Limens (Ría de Vigo) rico en *D. acuta* ilustran la complejidad de los perfiles de toxinas en los que pueden coexistir AO, DTX2 y PTX2.

La correlación entre el número total de células de *Dinophysis* y el contenido global de toxinas en los extractos de los arrastres fitoplanctónicos fue pobre. La proporción de las diferentes toxinas de carácter lipofílico (ej: derivados del AO y pectenotoxinas) en los perfiles de toxinas de *Dinophysis* puede ser muy variable en años diferentes e incluso en diferentes estaciones a lo largo de un mismo año. Se pone igualmente de manifiesto, como ya se describió en trabajos previos, la elevada variabilidad en el contenido de toxinas hallado en poblaciones naturales de *Dinophysis* (Andersen *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 1997).

El seco ácido de la PTX2 (PTX2SA) fue detectado en dos muestras de arrastres y llegó a ser la toxina predominante en una muestra de 1994. Estudios previos mostraron la predominancia de los seco ácidos de la PTX2 en moluscos pero no en el plancton (Suzuki *et al.*, 2001). La elevada cantidad de PTX2SA hallada en estas muestras no tendría que ser necesariamente producida por las células de *Dinophysis* y podría haber sido producida por otros componentes de los arrastres fitoplanctónicos que se alimentan de *Dinophysis* o bien el resultado de la conversión enzimática de PTX2 producida después de la filtración y almacenamiento de los arrastres. Para evitar las conversiones enzimáticas, las muestras tendrían que haber sido congeladas inmediatamente después de su obtención. En todas las muestras de plancton y mejillón en las que se detectó PTX2-SA, se encontró epi PTX2-SA, aunque en cantidades considerablemente menores.

Si bien los resultados obtenidos muestran a *D. acuta* y *D. caudata* como los principales agentes productores de la contaminación de los moluscos con pectenotoxinas en otoño, no se debe descartar la producción de estas toxinas por parte de *D. tripos* y *D. rotundata*, presentes en más bajas concentraciones, e incluso su producción por parte de *D. acuminata*, a pesar de la ausencia de PTXs en las muestras analizadas en este estudio.

El seco ácido de la PTX2 fue la pectenotoxina dominante en el perfil de toxinas de los mejillones expuestos a las poblaciones de fitoplancton de otoño, en los que las diatomeas están prácticamente ausentes, y las poblaciones de dinoflagelados están dominadas por *Dinophysis* (*D. acuminata*, *D. acuta* y *D. caudata*), siendo los niveles de PTX2 presentes en las muestras considerablemente menores que los del seco ácido correspondiente. Considerando que los niveles de seco ácido de la PTX2 encontrado en plancton fueran el resultado de transformaciones enzimáticas producidas durante la manipulación de las muestras, los resultados obtenidos en relación a la presencia de PTX2SA en mejillones están de acuerdo con trabajos previos que establecen que la PTX2 se convierte en PTX2SA tras la oxidación enzimática que tiene lugar en los tejidos del mejillón (Suzuki *et al.*, 2001). Aunque la carencia de estándar de PTX2SA no permitió su cuantificación en los mejillones, nuestros resultados sugieren que esta toxina puede estar presente en los tejidos del mejillón en concentraciones similares e incluso superiores al AO y la DTX2.

Las observaciones de este trabajo muestran que la PTX2 puede ser en ocasiones el componente mayoritario dentro del perfil de toxinas DSP del fitoplancton dominado por *D. acuta* y *D. caudata*, mientras que la PTX2SA puede ser el componente mayoritario en los mejillones.

La aplicación en rutina del bioensayo en ratón para la determinación de las toxinas en los moluscos permite la detección del AO y sus derivados, algunas pectenotoxinas y otras toxinas de carácter lipofílico. Los programas de monitorización basados en métodos de determinación de mayor especificidad que solo detecten el AO y sus derivados pudieran no ser adecuados desde el punto de vista de protección de la salud pública en áreas en las que exista riesgo de ocurrencia de PTXs y otras toxinas lipofílicas. Las principales dificultades para la aplicación de métodos químicos de carácter más específico provienen de las dificultades para obtener patrones de muchas de estas toxinas, que no están disponibles comercialmente y que son producidas por un número reducido de laboratorios para su uso particular. De todas formas, el análisis “multi-toxinas” por HPLC-MS se presenta como una

buena alternativa al bioensayo en la medida en que en un futuro próximo dichos estándares estén disponibles comercialmente.

La UE ha regulado recientemente un nivel máximo para las PTXs* (Decisión 2002/225/CE) y ha establecido que en el caso de que se utilicen métodos químicos, la PTX1 y la PTX2 deben ser monitorizadas. Teniendo en cuenta la importante contribución de la PTX2SA al perfil de toxinas de los mejillones de Galicia y otras regiones europeas, y el hecho de que esta toxina no es detectada por el bioensayo en ratón, parece urgente el desarrollo de estudios toxicológicos para elucidar el riesgo para la salud pública asociado a la ingestión de PTX2SA presente en los moluscos.

(* “El nivel máximo total de ácido okadaico, dinofisistoxinas y pectenotoxinas será de 160 µg de equivalentes de ácido okadaico/kg - el cuerpo entero o cualquier parte comestible por separado”).

ARTICULO 5: “Pectenotoxin 2 in single cells isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rías (NW Spain)”

El objetivo de los trabajos presentados en el artículo 5 fue investigar mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) la presencia de pectenotoxinas, AO y derivados en células aisladas de *D. acuta* y *D. caudata*.

Resultados y discusión:

En las condiciones de LC-MS utilizadas, la PTX2 fue el componente mayoritario del perfil de toxinas de las células de *D. acuta* y *D. caudata* aisladas por micromanipulación. No se detectó AO ni DTX2 en forma libre ni PTX2SA. El contenido celular de PTX2 fue muy elevado en todas las muestras de *D. caudata* analizadas ($> 100 \text{ pg cel}^{-1}$) y resultó más bajo en el caso de *D. acuta* (30 pg cel^{-1}).

Los resultados obtenidos sobre el perfil de toxinas de *D. caudata* están de acuerdo con nuestros hallazgos anteriores (Fernández *et al.*, 2001) que mostraron la presencia de AO a niveles traza. Sin embargo, las únicas referencias previas de la presencia de derivados de PTXs en *D. caudata* provienen de Australia (Eaglesham *et al.*, 2000; Burgess *et al.*, 2003) donde se utilizaron arrastres ricos en esta especie como fuente de obtención de PTX2SA. Nuestros resultados son los primeros obtenidos a partir de células aisladas y muestran valores muy elevados (hasta 130 pg cel^{-1}) que están dentro del rango del contenido total de PTX2 en *D. acuta* de Nueva Zelanda (MacKenzie *et al.*, 2005). La presencia de PTX2SA en sólo alguno de los arrastres ricos en *D. acuta* y *D. caudata* (Fernández *et al.*, 2003) y su ausencia

en las células aisladas de estas dos especies sugieren, de acuerdo con las observaciones de Suzuki *et al.* (1998; 2001) que la PTX2SA no está presente como tal en las células de *Dinophysis*, sino que es el resultado de conversiones enzimáticas. La ausencia de PTX2SA en nuestros estudios puede ser explicada por el hecho de que se trabajó con un número reducido de células que fueron aisladas cuidadosamente y que se sometieron inmediatamente a inactivación enzimática en el laboratorio.

Sin embargo, los resultados obtenidos con células de *D. acuta* de 2001, con un perfil tóxico únicamente compuesto de PTX2 (hasta 32 pg cel⁻¹) y sin trazas de AO ó DTX2 son sorprendentes si los comparamos con nuestros trabajos previos, en los que analizando por HPLC-FD (Lee *et al.*, 1987) células aisladas de la misma especie, recogidas en octubre de 1997, encontramos AO y DTX2 en un relación 3:2 como los principales componentes de *D. acuta*. Un arrastre del mismo año, dominado por *D. caudata* y *D. acuta* y analizado por el mismo método de LC-MS utilizado en el presente estudio mostró concentraciones de AO y DTX2 superiores a las de la PTX2. Si el AO y la DTX2 detectadas en las muestras de 1997 hubieran resultado de la hidrólisis enzimática de formas esterificadas, estos compuestos no habrían sido detectados en el caso de que las muestras hubieran sido sometidas previamente a una inhibición enzimática. Esto podría explicar la ausencia de AO y derivados en los arrastres ricos en *D. caudata* y *D. acuta* (Fernández *et al.*, 2003) y en células aisladas de *D. acuta* (de este estudio) del mismo lugar y estación, pero de diferentes años, y que si fueron sometidas a inhibición enzimática.

Otro aspecto sorprendente resulta de la comparación entre el elevado contenido de toxina encontrado en las células de *D. acuta* y *D. caudata* aisladas por micromanipulación (30-130 pg PTX2 cel⁻¹) y el contenido medio de toxinas por célula de *Dinophysis* (2.5 pg cel⁻¹) estimado a partir del análisis de arrastres obtenidos durante el mismo periodo (octubre 2001). Esta disminución en la señal podría ser explicada por un efecto matriz sobre la respuesta del detector debido a la influencia de sustancias coextraídas. Grandes diferencias entre el contenido de toxina obtenido a partir de células aisladas de *Dinophysis* y el obtenido a partir de arrastres han sido también documentadas en nuestros trabajos previos (Blanco *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 2001).

De cualquier forma, considerando que la actividad enzimática extracelular puede inducir a cambios considerables en los perfiles de toxinas originales, se debe tener un cuidado extremo durante la manipulación de las células de dinoflagelados, con el objeto de obtener

una información exacta sobre la composición original de toxinas. A la vista de los conocimientos actuales, los resultados previos sobre los perfiles de toxinas de *Dinophysis* spp deben ser considerados con cierta precaución. Parece también aconsejable la realización de ensayos de recuperabilidad cuando se realizan determinaciones sobre este tipo de matrices con la finalidad de reducir la incertidumbre de los resultados.

La PTX2 podría ser, por tanto, el componente mayoritario del perfil de toxinas del fitoplancton y la PTX2SA la principal pectenotoxina del perfil de los moluscos de las Rías Gallegas expuestos a las proliferaciones otoñales de *D. acuta* y *D. caudata*. La producción de estas toxinas por parte de otras especies de *Dinophysis* de la región tales como *D. tripos* y *D. rotundata*, presentes en menores concentraciones, o incluso por parte de *D. acuminata*, a pesar de que no fueran detectadas pectenotoxinas en las muestras analizadas, no debe ser descartada.

Los resultados obtenidos tienen importantes implicaciones en los programas de monitorización de toxinas. La Decisión 2002/225/EC establece un nivel máximo de AO y derivados y pectenotoxinas de 160 µg eq. AO kg⁻¹ de parte comestible y establece que en el caso de que se utilice un método químico, se deben monitorizar la PTX1 y la PTX2. No se menciona la PTX2SA, pero se establece que en caso de que se descubran nuevos análogos significativos desde el punto de vista de la salud pública, deberán ser incluidos en los programas de monitorización. Los datos sobre la toxicidad en humanos de la PTX2SA son todavía escasos e inciertos. Aunque niveles elevados de PTX2SA hallados en moluscos de Australia (*Donax deltoides*) en 1997 fueron considerados en un principio la causa de una severa intoxicación diarreica en humanos (Burguess and Shaw, 2001), estudios posteriores mostraron que los moluscos causantes de dicha intoxicación estaban contaminados con ésteres del AO.

Estudios recientes (Miles *et al.*, 2004) confirmaron la toxicidad en ratones de la PTX2 por administración intraperitoneal, pero la toxicidad oral que había sido establecida previamente por Ogino *et al.* (1997) no se confirmó en los experimentos. Estos mismos autores sugirieron que sus resultados eran posiblemente el reflejo de una absorción pobre de la PTX2 en el tracto gastrointestinal o de su conversión en un compuesto de menor toxicidad tal como PTX2SA. Este último compuesto presentó una toxicidad oral e intraperitoneal menor. Ninguna de las dos toxinas produjo efectos diarreicos. Estos resultados llevaron a sus autores a concluir que la diarrea severa en ratones atribuida por Ishige *et al.* (1998) fue el

resultado de una contaminación de las muestras con derivados del AO. Incertidumbres de esta índole en lo que respecta a los efectos tóxicos de las diferentes toxinas lipofílicas en mamíferos, pudieran haber sido más frecuentes de lo documentado, a la vista del conocimiento actual de que las pectenotoxinas y el ácido okadaico y sus derivados tienen un origen común, dinoflagelados del género *Dinophysis*, y que muy probablemente co-ocurren en moluscos expuestos a proliferaciones de estas microalgas.

En relación a los métodos de control, en el caso de que se utilice el bioensayo en ratón basado en la inyección intraperitoneal, la inyección del extracto daría lugar a una respuesta resultante de la combinación del AO y derivados y la pectenotoxinas, con la excepción de PTX2SA que no sería detectada (Daiguji *et al.*, 1998). Considerando que las regulaciones sobre las pectenotoxinas podrían ser modificadas en un futuro próximo, en la medida en que estén disponibles más datos toxicológicos, sería deseable que el bioensayo en ratón fuera complementado o incluso sustituido por ensayos o métodos que permitan discriminar entre las diferentes toxinas lipofílicas con distintos efectos sobre la salud pública.

CONCLUSIONES

El perfil de toxinas de *Dinophysis acuminata* está compuesto mayoritariamente por AO. No se detecta la presencia de DTX1, DTX2 ni de pectenotoxinas. Es posible que una parte importante del AO se encuentre en las células en forma de diol ésteres o de compuestos tipo DTX4 /DTX5.

El perfil de toxinas de *Dinophysis acuta* está compuesto por PTX2, AO y DTX2, esta última toxina siempre presente en menor cantidad que el AO. Al igual que en el caso de *D. acuminata*, existen indicios sólidos de que una parte significativa del AO y de la DTX2 se encuentran en las células en forma de diol ésteres o de compuestos tipo DTX4 /DTX5.

El perfil de toxinas de *D. caudata* está dominado por PTX2, observándose concentraciones de toxina por célula muy elevadas (del orden de 100 pg cel⁻¹).

En lo que se refiere al contenido de toxina por célula, se observa una gran variabilidad temporal y espacial entre las distintas especies y dentro de una misma especie.

Todas las cepas de *Prorocentrum lima* aisladas en Galicia son productoras de toxinas DSP. Las toxinas principales que contienen las diferentes cepas de *Prorocentrum lima* son AO, DTX1 y DTX2. AO y DTX2 aparecen en forma libre y esterificada mientras que DTX1 lo hace siempre en forma libre. Existe una notable heterogeneidad en contenido y perfil de toxinas entre las diferentes cepas.

CAPITULO II

ACUMULACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y ELIMINACIÓN DE LAS TOXINAS DSP EN LOS MOLUSCOS

INTRODUCCIÓN

El objetivo de los trabajos que constituyen este capítulo fue desarrollar la capacidad de predicción de la evolución de un episodio tóxico de tipo DSP en los moluscos, utilizando el conocimiento sobre las especies tóxicas y su capacidad de producción de toxinas adquirido a partir de los trabajos que constituyen el capítulo 1 y mediante el estudio de los procesos de acumulación, transformación y eliminación de las toxinas que tienen lugar en los moluscos.

Los estudios presentados en esta tesis doctoral han sido la primera aproximación al conocimiento de los procesos de acumulación, transformación y eliminación de las toxinas DSP en los moluscos, ya sea mediante un modelo de asimilación-depuración como el presentado en el artículo (Blanco *et al.*, 1995) o mediante un modelo de depuración-transformación como el presentado en (Fernández *et al.*, 1998).

En el artículo 6 “**Okadaic acid depuration in the mussels *Mytilus galloprovincialis*: one and two compartment models and the effect of environmental conditions**” se estudió la cinética de detoxificación del AO y el efecto sobre la misma de las condiciones ambientales, mediante la transferencia de mejillones contaminados a distintas zonas libres de toxinas y con diferentes condiciones ambientales. Se ensayaron cuatro modelos diferentes para describir la cinética de la depuración.

En el artículo 7 “**Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels**” se estudió mediante HPLC-FD el contenido en toxinas del grupo del AO de mejillones y utilizando una hidrólisis alcalina, se investigó la presencia de derivados acilados de baja polaridad “DTX3” en la fracción de hexano proveniente del proceso de purificación del extracto de mejillón.

En el artículo 8 “**Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain**” se estudió la cinética de detoxificación del AO, DTX2 y DTX3 mediante la transferencia de mejillones contaminados a una zona libre de toxinas y el análisis por HPLC-FD de los niveles de toxinas durante el periodo de depuración.

En el artículo 9 “**Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata***” se midió la concentración de toxinas DSP en plancton y en mejillones durante varios episodios de DSP causados por *D. acuminata* y se implementaron una serie de modelos que fueron ensayados

con los datos obtenidos, con el propósito de estimar la importancia de los diferentes procesos implicados en la asimilación, transformación y eliminación de las toxinas.

Al final del presente capítulo se expone un resumen de los resultados y discusión de los diferentes artículos, así como las conclusiones más relevantes de los mismos.

ARTÍCULO 6

Okadaic acid depuration in the mussels *Mytilus galloprovincialis*: one and two compartment models and the effect of environmental conditions.

Blanco, J., Fernández M.L., Míguez, A. and Morono, A. 1999. Marine Ecology Progress Series 176, 153-163.

Okadaic acid depuration in the mussels *Mytilus galloprovincialis*: one and two compartment models and the effect of environmental conditions.

RESUMEN

A continuación de un episodio de DSP en mejillones (*Mytilus galloprovincialis*) de la Ría de Pontevedra (Galicia, NO España) producido por organismos del género *Dinophysis*, un lote de mejillones contaminados fue transplantado a diferentes zonas no contaminadas, con diferentes condiciones ambientales. La cinética de depuración del AO (la toxina predominante en el episodio tóxico) fue monitorizada en cada lote experimental de mejillones durante un periodo de 70 días así como la salinidad, temperatura, fluorescencia, transmisión de luz y peso del cuerpo del mejillón. El efecto de las condiciones ambientales y del peso del cuerpo del mejillón en las tasas de depuración fue estudiado mediante un análisis de componentes principales y de un análisis de regresión múltiple. Aunque la mayor parte de las variables estudiadas mostraron un alto grado de covariación, la fluorescencia y la transmisión de luz, que se utilizan para medir el fitoplancton y la disponibilidad de sólidos para los mejillones, fueron los parámetros que tuvieron un efecto más prominente sobre la depuración. Con el propósito de describir la cinética de depuración, se ensayaron cuatro modelos: modelos de 1 y 2 compartimentos, cada uno de ellos en dos versiones, incluyendo y sin incluir los efectos de las 4 variables ambientales y el peso del cuerpo. El modelo de 1 compartimento sin la inclusión de las variables ambientales no dio lugar a una descripción apropiada de las cinéticas, pero cuando dichas variables fueron incluidas, el encaje general fue bueno y se identificó un patrón para explicar las desviaciones más importantes. El más simple de los modelos de dos compartimentos produjo resultados que describieron adecuadamente las cinéticas observadas. Sin embargo, los intentos de estimar los parámetros de los modelos de 2 compartimentos que incluyeron las variables complementarias desembocaron en un modelo de 1 compartimento. El modelo escogido para describir la cinética de la depuración tiene una influencia sustancial en la estimación del efecto de las variables ambientales.

Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions

Juan Blanco^{1,*}, María Luisa Fernández², Aurea Míguez², Ángeles Moroño¹

¹Centro de Investigaciones Mariñas, Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura, Xunta de Galicia, Pedras de Corón s/n, Aptdo. 13, E-36620 Vilanova de Arousa, Spain

²Laboratorio de Sanidad Exterior de Vigo, European Community Reference Laboratory on Marine Biotoxins, Estación Marítima s/n, E-36271 Vigo, Spain

ABSTRACT: Following an episode of Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) in mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Ría de Pontevedra (Galicia, NW Spain), produced by organisms of the genus *Dinophysis* (dinoflagellate), a batch of contaminated mussels was transplanted to several uncontaminated sites having different environmental conditions. The depuration kinetics of okadaic acid (the dominant toxin involved in the episode) in each experimental mussel batch was monitored during a 70 d period, as were the corresponding salinity, temperature, fluorescence, light transmission and mussel body weight. Environmental conditions and body weight were shown to have an effect on depuration rates by principal component and multiple regression analysis. Although most of the variables studied showed a high degree of covariation, fluorescence and light transmission, which serve to measure the availability of solids and phytoplankton for mussels, appeared to have the most prominent effect on depuration. Four different models were tested in order to describe depuration kinetics: 1- and 2-compartment models, each in 2 versions, with and without the inclusion of the effects of the 4 environmental variables studied and body weight. The 1-compartment model without the complementary variables did not give an appropriate description of the kinetics, but when these variables were included, the general fitting was good and a pattern was found in the most important deviations. The simplest of the 2-compartment models fitted also produced an output that adequately described the kinetics observed. However, attempts to estimate the parameters of 2-compartment models including the complementary variables consistently produced a 1-compartment model. The model chosen to describe depuration kinetics substantially influences the estimation of the effect of the environmental variables.

KEY WORDS: Okadaic acid · Depuration · Models · Mussel · Salinity · Temperature · Body weight · Fluorescence · Light transmission

INTRODUCTION

Marine phycotoxins are becoming one of the major threats to aquaculture and particularly to bivalve cultures (Shumway & Cembella 1993). There is a wide diversity of phycotoxins that differ in chemical structure and properties as well as in their biological activity. Their repercussions on aquaculture vary both geo-

graphically and temporally. Among the biologically active compounds, DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning) toxins are one of the most important types, because they are widely distributed and their episodes are usually long-lasting. The main toxins in this group are okadaic acid, DTX-1 (Murata et al. 1982) and DTX-2 (Hu et al. 1992, Blanco et al. 1995, Gago et al. 1996) and their acyl-derivatives, formerly described as DTX-3 (Yasumoto et al. 1985, Marr et al. 1992, Fernández et al. 1996). These toxins have diarrheagenic effects (Yasumoto et al. 1978) and are tumor promoters

*E-mail: jblanco@cimacoron.org

(Fujiki et al. 1988, Haystead et al. 1989, Suganuma et al. 1989). Even though these toxins do not cause mortality, morbidity is very high, and their presence in very small concentrations in bivalves makes them unsafe for human consumption. In most countries in which bivalve aquaculture is economically important, prolonged periods of shellfish contamination have led to great economic losses due to market bans.

Several approaches can be used to reduce the impact of DSP episodes. One is to reduce the importance of the toxic episode itself by reducing the contamination level and/or the duration of the depuration period, mainly by means of culture manipulation. Another possibility is to find a better management strategy for the culture by means of predicting the most likely duration of the episodes. Knowledge of both depuration kinetics and the effect of environmental conditions on depuration is essential to any of these approaches.

The depuration of several species of shellfish previously affected by DSP episodes has been studied by different authors. In some studies (Marcaillou-Le Baut et al. 1993, Shumway & Cembella 1993), a 2-step depuration curve was found, with high depuration rates during the first few days and much smaller rates afterwards. In other cases (Crocì et al. 1994), a unique depuration rate appears to exist for the whole depuration period. As in the case of PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) toxins, these 2 responses can be described by 2- and 1-compartment models, respectively (Silvert & Cembella 1995, Blanco et al. 1997). Blanco et al. (1995) have shown that a very simple 1-compartment

model can reasonably describe some DSP episodes in Galicia (Spain), but more complex models have not been tested.

The effect of the environmental conditions on depuration has not been directly evaluated. It is generally assumed that low temperatures lead to low depuration rates (Shumway & Cembella 1993) but no strong evidence of this fact exists. Differences in depuration rates between mussels maintained in a culture pond and at sea have also been shown (Marcaillou-Le Baut et al. 1993) and they have been attributed to differences in food resources.

The purpose of this work was to check the adequacy of 1- and 2-compartment models to describe the depuration kinetics of mussels *Mytilus galloprovincialis* affected by a *Dinophysis acuminata* and *D. acuta* episode in Galicia, and to study the effect of several environmental variables on the depuration rate.

MATERIALS AND METHODS

Experiment description and sample processing. In November 1994, mussels *Mytilus galloprovincialis* contaminated with DSP toxins (checked by HPLC, see 'Results') by a bloom of *Dinophysis acuta* and *D. acuminata* which had started in September and persisted on the date of sampling, were collected from Bueu (Ría de Pontevedra, Galicia, NW Spain; Fig. 1) and selected by shell length for an approximate size of 9 cm (mean = 9.057 cm; 95% confidence interval for the individual sizes = 7.817 to 10.297 cm). Finally, the mussels were randomly distributed among culture baskets (60 mussels each) with walls of 1 cm mesh that were distributed, also randomly, among 4 rafts (Pt 2, Pt 3, Pt 5 and Pt 6; Fig. 1) with 2 depths each (3 and 8 m), for a total of 8 sampling points, in the Ría de Arousa. Rafts and depths were chosen to minimize the covariation between salinity, temperature, fluorescence (as a measure of phytoplankton) and light transmission (as a measure of total seston volume) and also to offer a low probability of re-contamination. The choice was based on the analysis of weekly data obtained by the Centro de Control da Calidade do Medio Mariño (Consellería de Pesca, Xunta de Galicia) for November and December of the 3 previous years. Re-contamination was avoided but the elimination of the covariation between variables was not achieved.

Mussels were sampled (15 individuals from every combination of sampling point and depth) on a weekly basis at first and, when the depuration slowed down, at variable intervals. Environmental conditions were sampled twice a week during most of the experiment

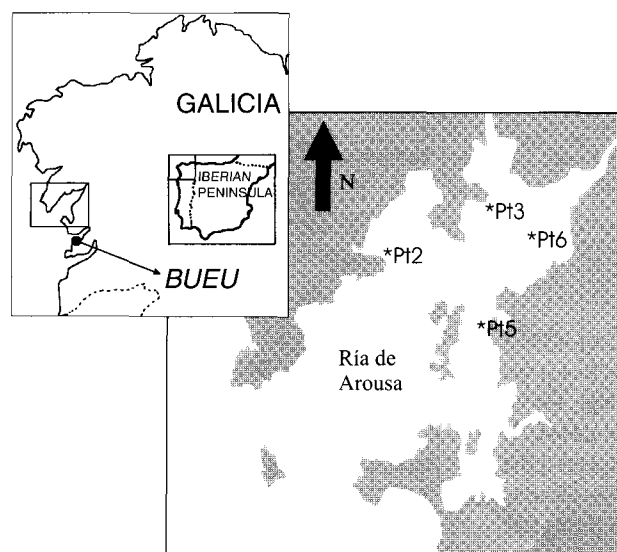


Fig. 1. Experimental sampling stations (Pt2, Pt3, Pt5 and Pt6) in the Ría de Arousa, Spain, and origin of the contaminated mussels *Mytilus galloprovincialis* (Ría de Pontevedra, Bueu)

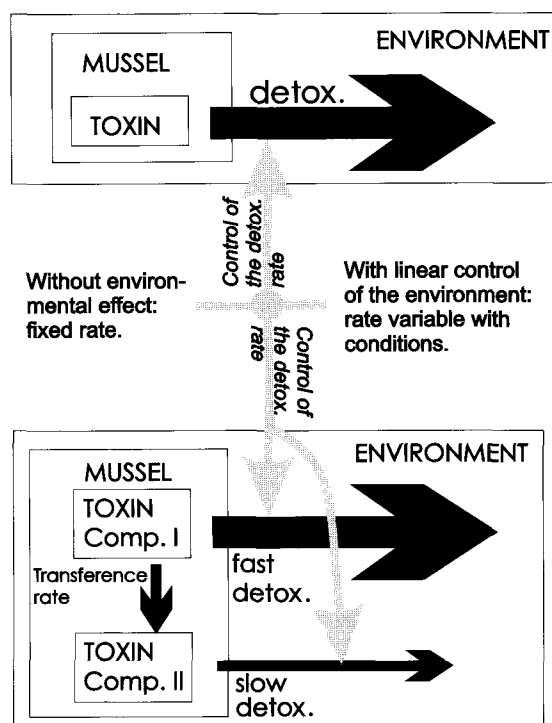


Fig. 2. Conceptual representation of the 1-compartment and 2-compartment models. Solid arrows represent toxin flows and shaded arrows represent the environmental control of the rates

with a CTD Sea-Bird 25 equipped with a Seatech Fluorometer and an integrated transmissometer.

Once in the laboratory, mussels were measured and weighed, and the 15 digestive glands pooled and homogenized. The DSP toxins contained in the homogenate were extracted and analyzed following the procedure given by Lee et al. (1987).

The effect of the environmental conditions and body weight on the depuration rate was identified by Principal Component Analysis (PCA) and quantified by multiple regression with forward inclusion using the Minitab 11 Statistical Package. Fluorescence data were logarithmically transformed. Two types of regressions and PCAs were carried out: (1) general, using all data of the experiment (all depuration periods and all sampling points and depths) and (2) per depuration period, using the 8 sampling points from each individual sampling date. Unless otherwise noted all significant observations or comparisons had a significance level of 95% ($p \leq 0.05$).

Models. One- and two-compartment models, which have previously been used to describe PSP depuration kinetics (Blanco et al. 1997), were also used in this study (Fig. 2). In the 1-compartment model it was assumed that all toxicity in the digestive glands of the mussels has the same depuration kinetics. Two ver-

sions of this basic model were used: one in which the depuration rate was independent from the environmental variables and body weight (it was therefore a constant), and another in which depuration rate was considered to be a linear combination of the environmental variables considered in this study and of the body weight (it was therefore calculated by a regression equation). The 2 versions of the 1-compartment model are formally described as follows:

Version 1—constant depuration rate

$$DR = K$$

$$d(\text{Tox})/dt = -DR \cdot \text{Tox}$$

Version 2—depuration rate linearly related with environmental variables and body weight

$$DR = a + b \cdot S + c \cdot T + d \cdot F + e \cdot Tr + f \cdot Bw$$

$$d(\text{Tox})/dt = -DR \cdot \text{Tox}$$

where DR = depuration rate (d^{-1}), a to f are constants, Tox = okadaic acid concentration in the digestive gland (expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$), S = salinity (psu), T = temperature ($^{\circ}\text{C}$), F = fluorescence (volts), Tr = transmittance (percentage of light transmitted) and Bw = body weight (g).

In the 2-compartment model it is also assumed that toxins are distributed in 2 compartments, the first having a fast and the second a slow depuration rate, and that a transfer from the first to the second compartment exists. The same 2 versions as in the 1-compartment model (constant or dependent on the environment depuration rates) were used. The formulation of these 2-compartment models is as follows:

Version 1—constant depuration rate

$$DR_1 = K_1$$

$$DR_2 = K_2$$

$$d(\text{Tox}_1)/dt = -DR_1 \cdot \text{Tox}_1 - CR \cdot \text{Tox}_1$$

$$d(\text{Tox}_2)/dt = -DR_2 \cdot \text{Tox}_2 + CR \cdot \text{Tox}_1$$

$$d(\text{Tox})/dt = d(\text{Tox}_1)/dt + d(\text{Tox}_2)/dt$$

Version 2—depuration rate linearly related with environmental variables and body weight

$$DR_1 = a_1 + b_1 \cdot S + c_1 \cdot T + d_1 \cdot F + e_1 \cdot Tr + f_1 \cdot Bw$$

$$DR_2 = a_2 + b_2 \cdot S + c_2 \cdot T + d_2 \cdot F + e_2 \cdot Tr + f_2 \cdot Bw$$

$$d(\text{Tox}_1)/dt = -DR_1 \cdot \text{Tox}_1 - CR \cdot \text{Tox}_1$$

$$d(\text{Tox}_2)/dt = -DR_2 \cdot \text{Tox}_2 + CR \cdot \text{Tox}_1$$

$$d(\text{Tox})/dt = d(\text{Tox}_1)/dt + d(\text{Tox}_2)/dt$$

where CR is the net transport rate from the first to the second compartment, numerical subscripts indicate compartment, and the remaining variables are as in the 1-compartment model.

The models which did not include environmental variables were fitted to the data by minimizing the sum of squares of the residuals by varying iteratively the depuration rate in the case of the 1-compartment model, or the depuration rates corresponding to each compartment, the transfer rate between compartments

and the initial proportion of the toxin contents in the first compartment in the case of the 2-compartment model.

The effect of the environmental variables was included in the models by means of the regression equations that link these variables with the depuration rate. In the 1-compartment model, only 1 regression is needed but in the 2-compartment model 1 regression for each compartment has to be estimated: one for the fast depurating and another for the slow depurating compartment (Compartments 1 and 2 respectively). All data obtained were used for fitting the regression needed for the 1-compartment model. For the 2-compartment model, all data corresponding to the first detoxification period were considered to be mostly affected by the fast depuration compartment (as depuration rates in this period are the fastest in the experiment) and they were, therefore, used to fit the first regression. The last 3 depuration periods were considered to be mainly affected by the slow depurating compartment and were, therefore, used to fit the second regression. The environmental effect was also directly implemented in the 2-compartment model by means of including the 2 regressions in the model and afterwards allowing their coefficients to vary during the iterative fitting process described previously.

RESULTS

Environmental variables and body weight

The environmental conditions showed differences in both time and space. The temperature range throughout the period studied was 2.2°C, from approximately 13 to 15.2°C. As is typical for a winter situation with thermal inversion, the surface had lower temperatures than the bottom. Salinity ranged from approximately 27 to 34.4 psu. Fluorescence and light transmission also showed great differences with both time and sampling point. Body weight also presented great differences and a slightly ascending general trend. Only for 2 out of the 8 sampling points was the final body weight lower than at the start, and these 2 points were also the ones with the greatest salinity oscillations during the period studied. A more detailed description of the environmental variables can be found in Blanco et al. (1997).

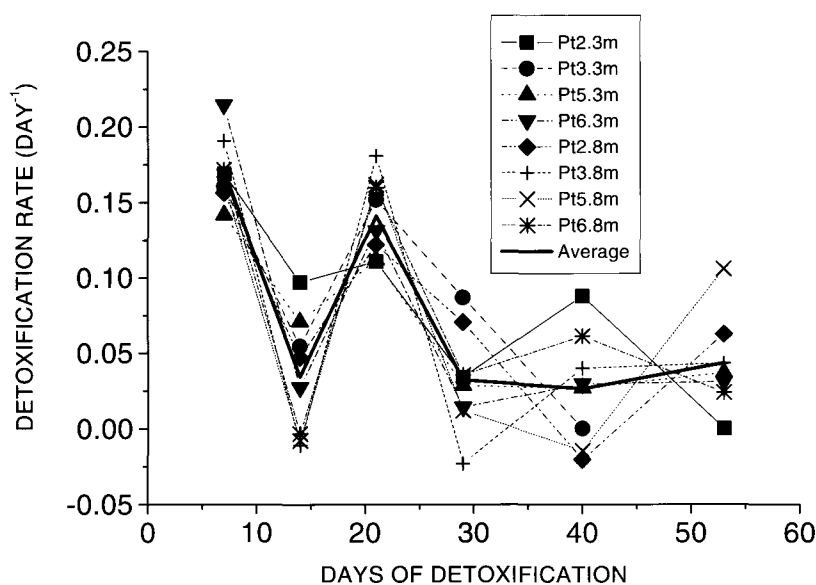


Fig. 3. *Mytilus galloprovincialis*. Variation of the depuration rates of okadaic acid in mussels from the 8 sampling points during the experiment and the average of all rates. Sampling points: Pt2.3 m = Stn Pt 2 at 3 m; Pt2.8 m = Stn Pt 2 at 8 m, etc.

Toxins, depuration rates and principal component analysis

Okadaic acid was the only toxin detected in relevant concentrations ($4.93 \mu\text{g g}^{-1}$ of digestive gland at the beginning of the experiment). Its depuration rate during this study ranged from 0.22 to 0.02 d^{-1} (Fig. 3). A decreasing trend for the first 4 depuration periods and stabilization from this point to the end of the experiment was observed.

The depuration curves observed showed an alternating pattern in which a low depuration rate followed a high one. This effect is probably due to the experimental error together with the calculation of the rates, since an observation that underestimates the real toxicity produces an overestimation of the previous rate and a subsequent underestimation of the following one. To partially avoid this problem we smoothed the data by means of averaging the observations corresponding to each 2 consecutive dates. We carried out the PCA and the regression analyses corresponding to the individual detoxification periods using these transformed data. In the analysis of the whole detoxification we used both smoothed and raw data.

Two groups of analysis were carried out. One included only the environmental variables and body weight, and the other also included the depuration rates. The first group (Figs. 4A, C & 5F to J) showed 2 principal components (PC) that account for most of the environmental and body weight variability. The envi-

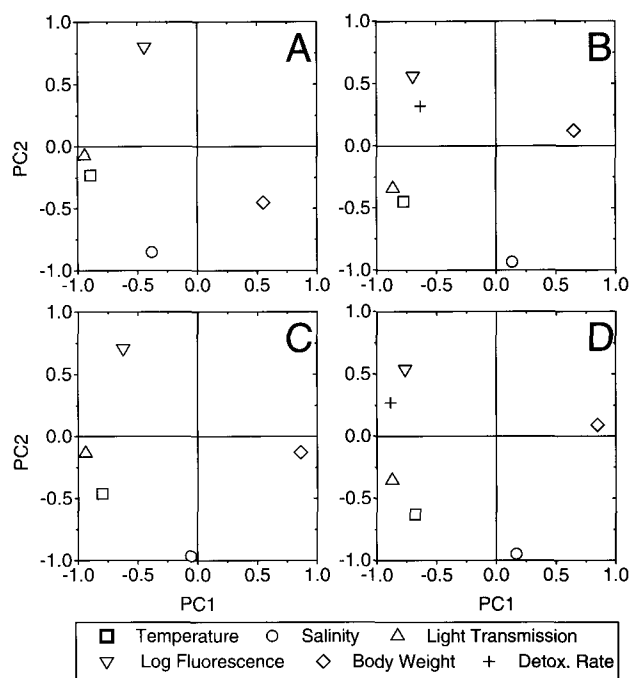


Fig. 4. *Mytilus galloprovincialis*. Loadings of the environmental variables and fresh body weight (A, C) and of the same variables also including okadaic acid depuration rate (B, D) on the first 2 principal components (PC1 and PC2) extracted from the raw data (A, B) and transformed by averaging each 2 consecutive sampling periods (C, D)

ronmental variables, with the exception of the global analysis of the experiment, were linked to 1 of the 2 extracted PCs (PC1 in most cases) and most of the body weight variability to the other. Salinity, temperature and light transmission were directly related to the PC that explained most of their variance, while fluorescence was inversely related. These 2 components accounted for most of the variation of the variables included in this study (82 to 89% of the variance).

The second group of analyses showed how the variability of the depuration rates related to the common variation of the environmental variables and body weight (Figs. 4B, D & 5A to E). The inclusion of the depuration rates as a new variable in the analyses did not substantially affect the principal components extracted, meaning that most of its variability was linked to that of the environmental variables and body weight. The depuration rate was, in general, related to a PC characterized by a high positive loading on temperature, salinity and light transmission, and a negative loading on fluorescence. This component was PC1 in the analyses carried out with each individual depuration period (Fig. 5A to E) and PC2 in the global analysis of the experiment (Fig. 4B, D). In the cases where the depuration rate was not very well correlated with this component, it was related to the other PC extracted, which, in general, included the body weight, but was inversely related to the depuration rate. As in the previous group, most of the variability

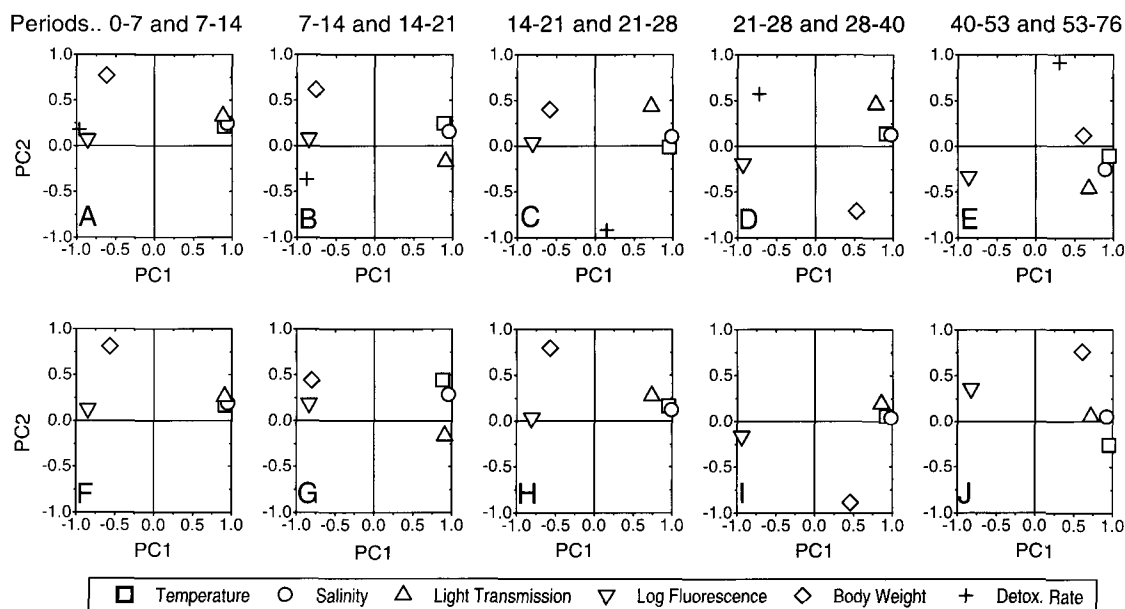


Fig. 5. *Mytilus galloprovincialis*. Loadings of the environmental variables and fresh body weight, including (A to E) and not including (F to J) okadaic acid depuration rate, on the first 2 principal components (PC1 and PC2) extracted from the data transformed by averaging each 2 consecutive sampling periods of the experiment. The averaged depuration periods (Days 0 to 7, 7 to 14, etc.) appear above the corresponding plots

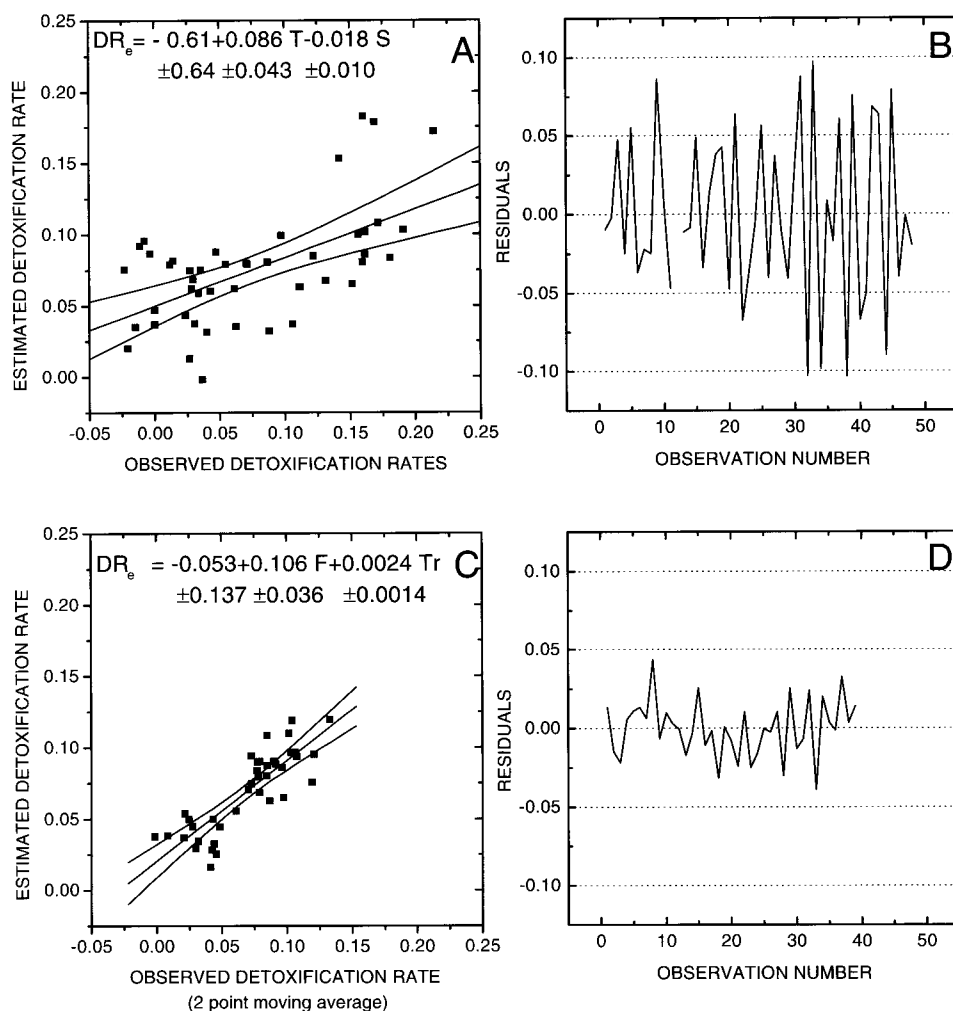


Fig. 6. *Mytilus galloprovincialis*. Results of the forward inclusion multiple regression analysis of okadaic acid depuration rate with the environmental variables and mussel fresh body weight. T = temperature, S = salinity, F = fluorescence (logarithmically transformed) and Tr = light transmission. 95% confidence limits for each coefficient and intercept are given below their corresponding values. (A) and (C) Relationship between depuration observed and depuration predicted by regression (DR), using raw and 2-point moving averaged data, respectively. (B) and (D) Corresponding residual deviations for (A) and (C)

(from 77 to 89% of the total variance) was explained by the 2 PCs extracted.

General regression analysis

Salinity and temperature were the only variables significantly related to depuration rate by forward inclusion multiple regression (Fig. 6A) (with negative and positive coefficients, respectively). Individually, however, the logarithmically transformed fluorescence was the variable most correlated with the depuration rate. As most of the variation can be explained by 2 PCs, one closely related to temperature, light transmission and body weight, and the other to fluorescence and salinity (the latter has a negative loading, Fig. 4A, C) it is

impossible to discriminate between the effects of the individual variables. Temperature was the variable most correlated with the depuration rate among the 3 related to PC1 (temperature, light transmission and body weight). The effect of salinity, the variable most significantly related to depuration rate by regression among those related with PC2, has no apparent explanation. In view of this difficulty, we decided to check the possibility that the main factor responsible for this relationship was, in fact, fluorescence (the other variable related to PC2), which was also the variable that showed the highest correlation with the depuration rate when considered individually. When salinity was excluded from the analysis, the 2 significant variables were temperature and fluorescence, and the total explained variance was reduced by approximately

4 %. Both multiple regressions accounted for a small percentage of the total variance (33.9 and 28 % in the first and second cases respectively), and the corresponding residuals were found to be strongly affected by the sampling date, showing an alternating pattern (Fig. 6B). As no relation was found between these residuals and the other factors studied, we attributed them to the errors in toxin quantification, inherent in the technique, that led to a situation whereby if one rate is overestimated the next one is underestimated. To partially avoid this problem, as in the case of PCA, we smoothed all the variables by means of a moving average of every 2 consecutive points. When the same kind of regression was fitted to the new data, light transmission and fluorescence were the only 2 significant contributors (Fig. 6C), both with positive coefficients, accounting for 70.6 % of the total variance. If light transmission was removed from the analysis, following the same criteria as previously with salinity, then temperature and fluorescence were the significant variables and the percentage of variance explained was reduced by only 1.4 %. In this case, the alternating pattern of the residuals with the sampling date was also found, but was much less pronounced than in the analysis of the raw data (Fig. 6D).

Regression analysis for each sampling date

It was not possible to find any consistent relationship between the depuration rate in each depuration period and the environmental variables. In several periods, the depuration rate was not significantly related to any environmental variable and, in the cases where such a relationship was present, the variables involved and the signs of the corresponding coefficients showed no recognizable pattern (Table 1).

As noted in the previous section, the residuals of the regression showed an alternating pattern, and we used

Table 1. Results of the forward inclusion regression for each sampling. (+) and (-): sign of the coefficients when the variables were included in the regression is shown. ni: variables not included in the equation. *T*: temperature (°C), *S*: salinity (psu), *Tr*: percentage of light transmitted, *F*: fluorescence, *Bw*: body weight (g)

Day	<i>T</i>	<i>S</i>	<i>Tr</i>	Log <i>F</i>	<i>Bw</i>
1	ni	ni	ni	ni	ni
2	ni	-	ni	ni	+
3	ni	ni	ni	-	ni
4	ni	ni	ni	ni	ni
5	ni	ni	ni	ni	ni
6	ni	ni	ni	ni	ni
1 to 6	+	-	ni	ni	ni

Table 2. Results of the forward inclusion regression for the combination of each 2 consecutive sampling dates (moving average of the raw values). Sign (+ or -) of the coefficients when the variables (see Table 1 for definitions) were included in the regression is shown. ni: variables not included in the equation

Day	<i>T</i>	<i>S</i>	<i>Tr</i>	Log <i>F</i>	<i>Bw</i>
1 + 2	ni	-	ni	ni	+
2 + 3	ni	-	ni	ni	ni
3 + 4	ni	ni	ni	ni	ni
4 + 5	ni	-	ni	ni	ni
5 + 6	ni	ni	ni	ni	ni
1 to 6	ni	ni	+	+	ni

2-point moving averages instead of raw data. Of the 5 periods obtained (1 period is lost in the calculation of the moving averages) 3 showed significant results (Table 2). The negative relationship of depuration rate with salinity was the most relevant result. This variable shares most of its variation with temperature, light transmission and fluorescence, and it is consistently related to PC1 in the PCA corresponding to each date (Fig. 5).

Model fitting

All models fit the observed depuration quantitatively well, explaining 97, 96 and 99 % of the variance (1-compartment, 1-compartment with environmental variables and 2-compartment, respectively). Notwithstanding, they differed in the qualitative aspects of the fitting, which is shown by the way in which the residuals are distributed (Fig. 7). The 1-compartment model without environmental account did not correctly describe the final part of the depuration either in toxin content, which was underestimated (positive residuals, Fig. 7A), or in trend, with the actual data showing a decreasing trend that was not observed in the response expected from the model (Fig. 8A). When the results from the global regression between the depuration rate and the environmental variables were included, the model fit the observed data qualitatively better (Figs. 7B & 8B), as is shown by the much more centered distribution of the residuals (Fig. 7B), with the only exception being those corresponding to Day 7.

The 2-compartment model (without including the environmental variables and body weight) fit the actual data well (Figs. 7C & 9). The values obtained for the first sampling period were much closer to the observed values than in the 2 previous models and the residuals were fairly well centered. The estimated parameters for this model were a depuration rate for the first and second compartments of 0.17 and 0.10 d⁻¹,

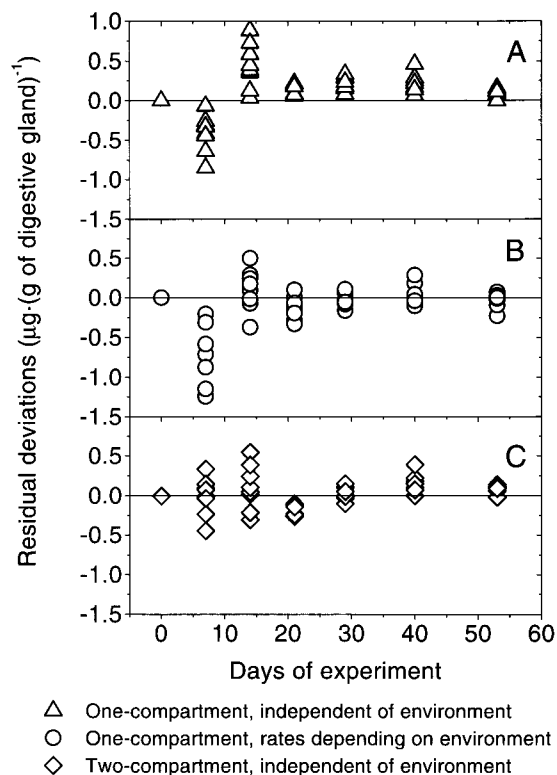


Fig. 7. *Mytilus galloprovincialis*. Residual deviations corresponding to the 3 depuration models fitted to the observed data. (A) 1-compartment model independent of the environment, (B) 1-compartment model including the effect of environment, and (C) 2-compartment model independent of the environment

respectively, a transfer rate between Compartments 1 and 2 of 0.31 d^{-1} and an initial contribution of toxins in the first compartment to the total of 99.9%.

As mentioned in 'Materials and methods', we followed 2 different strategies to implement the effect of the environmental variables on the 2-compartment model. In both cases, after optimization, the parameters obtained caused the initial model to revert to a 1-compartment model because 100% of the initial toxicity was put in the first compartment and the transfer rate from Compartment 1 to Compartment 2 was estimated to be zero. This indicates that all the depuration takes place in Compartment 1 and, therefore, that the model is a 1-compartment model.

DISCUSSION

The depuration rates found in this study are very close to our previous estimates in the same area, although they were obtained by optimizing the fit of a contamination-depuration model (Blanco et al. 1995). They were slightly lower than those found in other studies on *Mytilus galloprovincialis* such as those by Poletti et al. (1996) and Croci et al. (1994) for depuration using ozone (from nearly 0 to 0.27 d^{-1}). Marcaillou-Le Baut et al. (1993) also found lower depuration rates, 0.07 and 0.08 d^{-1} , for Mediterranean and Breton mussels respectively (in the latter case during the first 15 d and subsequently decreasing).

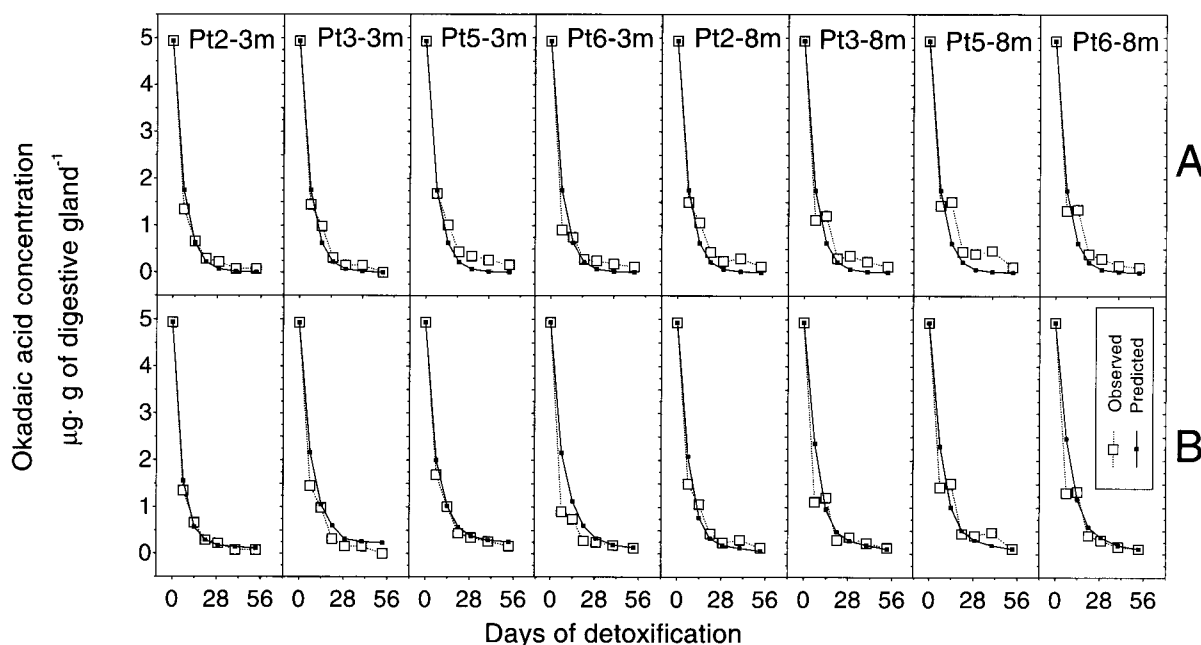


Fig. 8. *Mytilus galloprovincialis*. Depuration kinetics and fitted 1-compartment models for each sampling point (Pt2-3 m: Stn Pt 2 at 3 m; Pt2-8 m: Stn Pt 2 at 8 m; etc.) (A) Fitted fixed rate models (without environmental effect) and (B) corresponding variable rate models (environmentally determined rates). Toxin concentration is expressed as μg of total toxins per gram of digestive gland

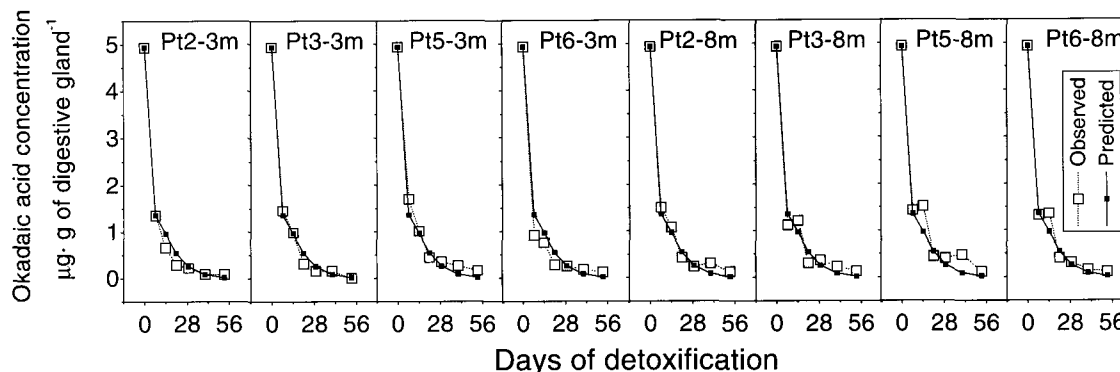


Fig. 9. *Mytilus galloprovincialis*. Depuration kinetics and fitted 2-compartment model for each sampling point. The fitted fixed rate model (without environmental effect) is shown. Toxin concentration is expressed as μg of total toxins per gram of digestive gland

From the PCA it would seem that, in general, the depuration rate was related to a group of variables that covary: temperature, salinity, light transmission and fluorescence; and also to body weight. Its inverse relationship with the PC in which temperature, light transmission and salinity had positive loadings and fluorescence negative, cannot be easily explained by temperature or salinity. Temperature, in the temperature range of this study, is expected to accelerate the metabolic processes and to increase the filtration rates in *Mytilus edulis* (Bayne et al. 1976, Jørgensen et al. 1990, Riisgård 1991, Hawkins & Bayne 1992), and it would presumably have a similar effect on *M. galloprovincialis*. Those effects would probably lead to an increase in depuration rates rather than to the reduction found in this study. A negative effect of this factor on depuration therefore seems unlikely. The global regression analysis showed a positive relationship between these 2 variables, as would be expected, but the regressions obtained for each sampling date and the already described PCA indicated a negative relationship. The origin of this discrepancy seems to be the systematic decrease of temperature during the experiment. Due to this trend, the fastest depuration rates, which were characteristic of the early depuration period, were recorded simultaneously with the highest temperatures while the opposite situation was produced during later depuration. This trend did not affect the estimate of the effect of temperature when the individual depuration periods were analyzed and, therefore, in these individualized analyses, the actual effect of temperature and/or its covariates is estimated. Low salinity may have an effect, mainly through the decreasing of the osmotic pressure, but it also seems unlikely that it would affect the depuration of these kinds of compounds, which are lipid-soluble and which are highly likely to be bound to cellular components. Light transmission and fluorescence, however,

may explain the effect of this group of variables. The former is inversely related to the seston concentration, in volume, and the latter to the phytoplankton concentration. The inverse relation of light transmission to depuration rate indicates that seston volume, and therefore the amount of food available for the mussels, may be a variable that actually affects the depuration process. The same conclusion may be drawn from fluorescence: its direct relationship with depuration rates also indicates that the phytoplankton concentration is involved in the regulation of the depuration rates. There is some evidence of the effect of phytoplankton concentration on the contamination-depuration kinetics of DSP toxins in mussels. The observations made by Sampayo et al. (1990) in several DSP episodes produced by *Dinophysis* spp. on the Portuguese coast suggest that depuration rates increase with phytoplankton concentration and also that, when the contribution of DSP producing species to the total phytoplankton biomass is low, the contamination of mussels is slower than when it is high. As in the case of PSP toxins (Blanco et al. 1997), we believe that phytoplankton concentration affects the process of depuration by increasing the digestive activity, which also leads to an increase in the metabolic fecal losses, thereby probably flushing out the bound toxins. These kinds of losses are made up mainly of remains of cells from the digestive gland tubules (Hawkins et al. 1990) which presumably had accumulated toxins and, in this way, are eliminated. As this mechanism may constitute as much as 60% of the organic matter in the feces (Hawkins et al. 1990), it might be the main elimination mechanism of the toxins contained in the digestive gland.

A relationship between depuration rate and body weight can also be extracted from the PCA. This relationship was inverse and not fully supported by the regression analysis, in which different responses were found on different dates. In some cases body weight

seems to have a positive effect on depuration. These cases may be explained by the toxin dilution effect demonstrated for PSP toxins by Bricelj et al. (1990), and which is derived from the fact that, with constant toxin content, if the body weight of the bivalves increases, then the toxin concentration per unit of weight decreases and also by the fact that larger mussels have larger metabolic fecal losses (Hawkins et al. 1990). Nonetheless, in most of the cases in this experiment, there was an inverse relation between depuration and body weight, and therefore it cannot be explained as described previously. In our opinion, this relation was produced by the higher depuration capability of small mussels as compared to larger specimens, as was found for domoic acid (Wohlgeschaffen et al. 1992). The variation in mussel size due to the random sampling will probably allow for detection of this effect.

From our results it cannot be clearly concluded whether the DSP depuration in this species evolves following 1- or 2-compartment kinetics because the benefit obtained by fitting a 2-compartment model is partially overlapped by the effect of including the environmental variables in the model. It is obvious that the 1-compartment model with a fixed depuration rate did not fit the actual data as well as the other 2 models, but the differences between the latter 2 models are not clear, with each having its strengths and its weaknesses. The 1-compartment model with environmental variables included fit the peculiarities of each data set better. The 2-compartment model, on the other hand, fit the first depuration point in each data set better. In our opinion the 1-compartment model that includes the environmental variables and body weight is more realistic than the 2-compartment model because its main drawback, the poor fitting of the first point of each data set, (1) coincides with an atypically low okadaic acid concentration for these points followed by similar or higher toxin contents on the next sampling date, and (2) seems to be derived from one or several unknown factors which were not monitored during the experiment, as it showed a pattern in which the deviation of the model was larger in the bottom (8 m) than in the surface samples (3 m) and followed the same station order at each depth, and also because DSP analyses are carried out on the digestive gland, and therefore the second compartment does not involve other organs and, thus, might comprise a smaller fraction of the analyzed biomass than in the case of PSP (Blanco et al. 1997).

Our inability to fit the 2-compartment model including environmental conditions may also be affected by the precision of the toxin quantification of the first depuration point, because very small errors might make impossible the discrimination between 2 models that fit so well. If this point has been significantly

affected by random sampling or analytical errors, our estimation of the effect on these conditions on the first compartment would be inadequate and the model might be incorrectly fitted.

If we consider the 2-compartment model to be the most realistic, we must conclude that the environmental variables have little or no importance in regulating the depuration, which is in contrast with the small distortion that the inclusion of the depuration rate induced on the components extracted by PCA. In this case, the 2 compartments would have depuration rates which are very different from each other and a very high transfer rate (0.3 d^{-1}).

In conclusion, it would appear that environmental conditions, mainly through the amount of available food, affect the depuration kinetics of okadaic acid, but the real influence of these variables cannot be quantified if a depuration model is not previously assumed.

Acknowledgements. This work was funded by the Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura, and CICYT (Project ALI-95-1012-C05-02). We thank M. C. Mariño and M. Miranda for their technical assistance and the department of biotoxins of the Centro de Control de Calidade do Medio Mariño for obtaining the experimental mussels and their help in the preparation of the experiment.

LITERATURE CITED

- Bayne BL, Thompson RJ, Widdows J (1976) Physiology I. In: Bayne BL (ed) *Marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, p 121–206
- Blanco J, Fernández M, Mariño J, Reguera B, Míguez A, Maneiro J, Cacho E, Martínez A (1995) From *Dinophysis* spp. toxicity to DSP outbreaks: a preliminary model of toxin accumulation in mussels. In: Lasso P, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcaillou C (eds) *Harmful marine algal blooms*. Lavoisier, Intercept Ltd, Paris, p 777–782
- Blanco J, Morono A, Franco J, Reyero MI (1997) PSP depuration kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One- and two-compartment models and the effect of some environmental variables. *Mar Ecol Prog Ser* 158:165–175
- Bricelj VM, Lee JH, Cembella AD, Anderson DM (1990) Uptake and kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Ecol Prog Ser* 63:177–188
- Croci L, Toti L, De Medici D, Cozzi L (1994) Diarrhetic shellfish poison in mussels: comparison of methods of detection and determination of the effectiveness of depuration. *Food Microbiol* 24:337–342
- Fernández ML, Míguez A, Cacho E, Martínez A (1996) Okadaic acid esters in Spanish mussels. *Toxicon* 34: 381–387
- Fujiki H, Suganuma M, Suguri H, Yoshizawa S, Takagi K, Uda N, Wakamatsu K, Yamada K, Murata M (1988) Diarrhetic shellfish toxin dinophysistoxin-1 is a potent tumour promoter on mouse skin. *Jpn J Cancer Res* 79:1089–1093
- Gago A, Rodríguez Vázquez JA, Leao JM, Comesaña M, Quilliam MA, Thibault P (1996) 1985–1995. A decade of studies on PSP and DSP toxins in Spanish mussels by chemical methods. In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y

- (eds) Harmful and toxic algal blooms. IOC of UNESCO, Paris, p 7–10
- Hawkins AJS, Bayne BL (1992) Physiological interrelations, and the regulation of production. In: Gossling E (ed) The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. Elsevier, Amsterdam, p 171–222
- Hawkins AJS, Navarro E, Iglesias JIP (1990) Comparative allometries of gut content, gut passage time and metabolic faecal loss in *Mytilus edulis* and *Cerastoderma edule*. Mar Biol 105:197–204
- Haystead TAJ, Sim ATR, Carling D, Honnor RC, Tsukitani Y, Cohen P, Hardie DG (1989) Effect of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. Nature 337:78–81
- Hu T, Doyke J, Jackson D, Marr J, Nixon E, Pleasance S, Quilliam MA, Walter JA, Wright JLC (1992) Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from Irish mussels. Chem Commun 30:39–41
- Jørgensen CB, Larsen PS, Riisgård HU (1990) Effects of temperature on the mussel pump. Mar Ecol Prog Ser 64:89–97
- Lee JS, Yanagi T, Kenma R, Yasumoto T (1987) Fluorimetric detection of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. Agric Biol Chem 51:877–881
- Marcaillou-Le Baut C, Bardin B, Bardouil M, Bohec M, Le Dean L, Masselin P, Truquet P (1993) DSP depuration rates of mussels reared in a laboratory and an aquaculture pond. In: Smayda TJ, Shimizu Y (eds) Toxic phytoplankton blooms in the sea. Elsevier, Amsterdam, p 531–535
- Marr JC, Hu T, Pleasance S, Quilliam M, Wright J (1992) Detection of new 7-O-acyl-derivatives of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography-mass spectrometry. Toxicon 30:381–387
- Murata M, Shimatani M, Sugitani H, Oshima Y, Yasumoto T (1982) Isolation and structural elucidation of the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning. Bull Jpn Soc Sci Fish 43:549–552
- Poletti R, Viviani R, Casadei C, Lucentini L, Giannetti L, Funari E, Draisci R (1996) Decontamination dynamics of mussels naturally contaminated with diarrhetic toxins relocated to a basin of the Adriatic Sea. In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y (eds) Harmful and toxic algal blooms. IOC of UNESCO, Paris, p 429–432
- Riisgård HU (1991) Filtration rate and growth in the blue mussel, *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758: dependence on algal concentration. J Shellfish Res 10:29–35
- Sampayo MA, Alvito P, Franca S, Sousa I (1990) *Dinophysis* spp. toxicity and relation to accompanying species. In: Granéli E, Sundström B, Edler L, Anderson DMM (eds) Toxic marine phytoplankton. Elsevier, New York, p 215–220
- Silvert W, Cembella AD (1995) Dynamic modelling of phycotoxin kinetics in the blue mussel, *Mytilus edulis*, with implications for other marine invertebrates. Can J Fish Aquat Sci 52:521–521
- Shumway SE, Cembella AD (1993) The impact of toxic algae on scallop culture and fisheries. Rev Fish Aquat Sci 1:121–150
- Suganuma M, Suttajit M, Suguri H, Ojika M, Yamada K, Fujiki H (1989) Specific binding of okadaic acid, a new tumour promoter in mouse skin. FEBS Lett 250:615–618
- Wohlgelassen GD, Mann KH, Subba Rao DV, Pocklington R (1992) Dynamics of the phycotoxin domoic acid: accumulation and excretion in two commercially important bivalves. J Appl Phycol 4:297–310
- Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M (1978) Occurrence of a new type of toxic shellfish in Japan and chemical properties of the toxin. Bull Jpn Soc Sci Fish 44:1249–1255
- Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Sano M, Matsumoto, GK Clardy J (1985) Diarrhetic shellfish toxins. Tetrahedron 41:1019–1025

Editorial responsibility: Otto Kinne (Editor),
Oldendorf/Luhe, Germany

Submitted: February 27, 1998; Accepted: September 24, 1997
Proofs received from author(s): January 11, 1999

ARTÍCULO 7

Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of
Spanish mussels.

Fernández, M.L., Miguez, A., Cacho, E. and Martinez, A. 1996. Toxicon, 3,
381-387.

Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels

RESUMEN

Se han documentado dos tipos de derivados de baja polaridad del AO en moluscos o en fitoplancton: 7-O- acil- ésteres con un ácido graso esterificando el grupo OH en posición 7 y los diol ésteres en los que el grupo carboxílico de las toxinas ha sido esterificado. Estos compuestos no pueden ser detectados directamente por cromatografía líquida y detección fluorimétrica de los derivados del 9-antril-diazometano, debido en el caso del primer grupo a su baja polaridad y elevado peso molecular y en el caso del segundo grupo debido a la presencia del grupo carboxilo esterificado. Todos ellos deben ser hidrolizados antes de la derivatización, de manera que puedan ser detectados como derivados de ADAM de las correspondientes toxinas no aciladas o no esterificadas. En el procedimiento de Lee (1987), después de la extracción de las glándulas digestivas con metanol al 80%, se realiza una partición líquido-líquido con un disolvente no polar tal como el hexano con el objetivo de eliminar los lípidos no polares. La presencia de toxinas no polares fue investigada en mejillones españoles y confirmada en la capa de hexano, usualmente desechada en los procedimientos convencionales de extracción, mediante el análisis de los productos de la hidrólisis alcalina. Se demuestra la solubilización preferente de estas toxinas en un solvente no polar tal como el hexano. Se sugiere la inclusión en el procedimiento general de una etapa de hidrólisis del extracto de hexano con la finalidad de monitorizar la contribución de las toxinas DSP no polares a la toxicidad DSP total de los moluscos. Esta es la primera documentación de otras toxinas DSP diferentes al OA y a la DTX2 en mejillones españoles.



DETECTION OF OKADAIC ACID ESTERS IN THE HEXANE EXTRACTS OF SPANISH MUSSELS

M. L. FERNÁNDEZ, A. MÍGUEZ, E. CACHO and A. MARTÍNEZ

Laboratorio de Sanidad Exterior de Vigo, European Community Reference Laboratory on Marine Biotoxins, Estación Marítima, s/n-36271 Vigo, Spain

(Received 18 July 1995; accepted 14 September 1995)

M. L. Fernández, A. Míguez, E. Cacho and A. Martínez. Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. *Toxicon* **34**, 381–387, 1996.—Two types of low polar derivatives of OA and dinophysitoxins have been reported in shellfish or in phytoplankton: 7-*O*-acyl esters containing a fatty acyl group attached through the 7-OH group and diol esters in which the carboxylic group of the toxins has been esterified. These compounds cannot be directly detected by liquid chromatography and fluorimetric detection as 9-anthryldiazomethane derivatives, owing in the first case to their low polarity and high molecular weight, and in the second case because they have the carboxylic group esterified. All of them must be hydrolysed before derivatization to be detected as Adam derivatives of the corresponding non-acylated toxins. In the Lee procedure, after extraction of the shellfish digestive glands with 80% methanol, a liquid–liquid partition with a non-polar solvent such as hexane is carried out in order to remove non-polar lipids. The presence of non-polar toxins was investigated in Spanish mussels and confirmed in the hexane layer, usually discarded in conventional extraction procedures, by analysis of the alkaline hydrolysis products. A preferred solubilization of these toxins in a non-polar solvent like hexane is reported. The inclusion of a hydrolytic step of the hexane extract in the general procedure is suggested in order to monitor the contribution of non-polar diarrhoeic shellfish poisons (DSPs) to the total DSP shellfish toxicity. This is the first report of DSPs other than OA and DTX2 in Spanish mussels.

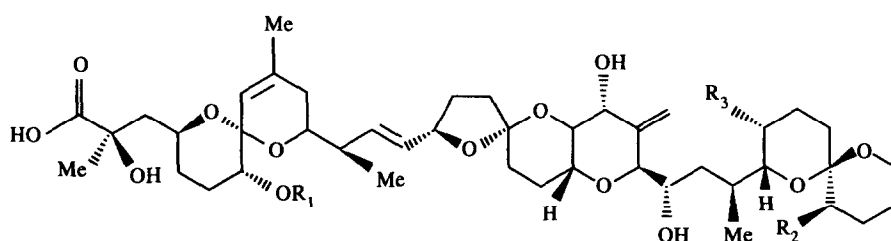
INTRODUCTION

Diarrhoeic shellfish poisons (DSP) are a severe public health and economic problem of world-wide occurrence. They are produced mainly by dinoflagellates such as planktonic *Dinophysis* spp and benthic *Prorocentrum* spp (Lee *et al.*, 1989). The main toxins responsible for DSP are okadaic acid, DTX1 and DTX2. Besides these toxins, the presence of 7-*O*-acyl-ester derivatives of OA, DTX1 and DTX2 was demonstrated in the digestive glands of Japanese scallops (Yasumoto *et al.*, 1985) and in Irish mussels (Marr *et al.*, 1992) (Fig. 1). As they have not been found in dinoflagellates producing DSPs, they are thought to be products of metabolic activity in the digestive glands of the molluscs. Their toxicity (500 µg/kg) is considerably lower than that of OA and DTX2 (200 and 160 µg/kg) (Yasumoto *et al.*, 1989).

Other ester derivatives of DSP toxins, mainly diol-esters, have been described in *Prorocentrum lima* (Yasumoto *et al.*, 1987) and *Prorocentrum concavum* (Hu *et al.*, 1993) cultures. In this case the esterification is produced at the carboxylic group (Fig. 2), responsible for the biological activity of the DSPs, and although in principle their toxicological activity is cancelled, their potential toxicity evident after hydrolysis (Cádenas *et al.*, 1994) cannot be ignored. The implication of benthic dinoflagellates in DSP intoxication has been hypothesized but not yet totally proved, nor have these compounds been detected in shellfish.

The most common DSP test for shellfish monitoring is the mouse bioassay (Yasumoto *et al.*, 1978). This is a non-selective method that detects all lipid toxins, and although for this reason it is very suitable for the safe control of shellfish, it provides poor information about toxin composition.

Chemical methods for direct DSP detection such as high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection of DSP derivatives, or liquid chromatography



	R ₁	R ₂	R ₃
Okadaic acid (OA)	H	H	Me
Dinophysistoxin-1 (DTX-1)	H	Me	Me
Dinophysistoxin-2 (DTX-2)	H	Me	H
7-O-Acyl derivatives	acyl		

Typical Acyl
groups

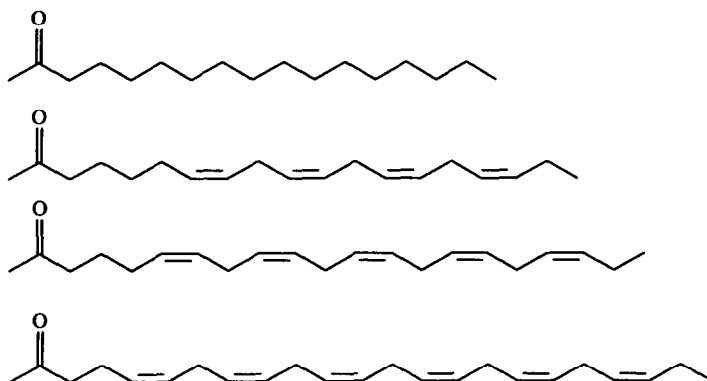


Fig. 1. Structures of okadaic acid and related DSP toxins.

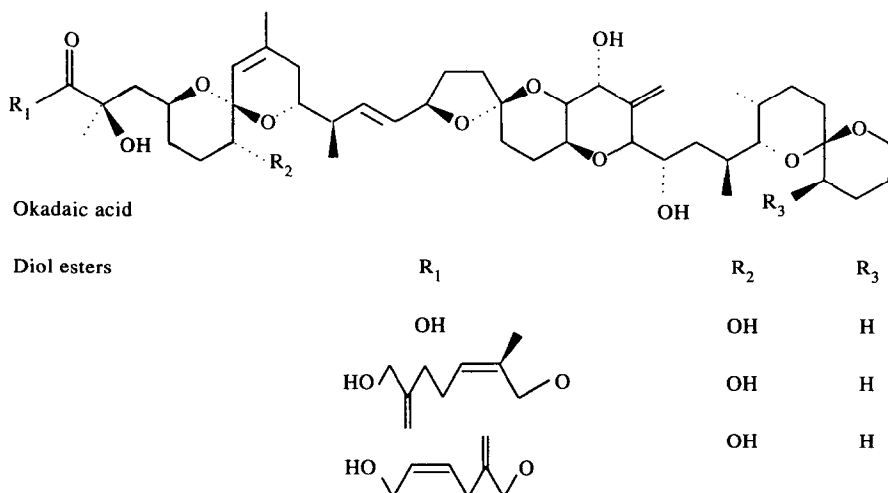


Fig. 2. Okadaic acid and its diol esters.

coupled with mass spectrometry (LC–MS) have been shown to be valuable analytical tools in characterizing toxin profiles in phytoplankton and shellfish. Although LC–MS is without doubt the most powerful technique for confirming the identities of toxins and identifying new toxins, the equipment required is very sophisticated and expensive, and not available in most of the laboratories involved in marine biotoxin analysis. For this reason, HPLC with fluorimetric detection, and in particular Lee's procedure (1987) which uses 9-anthryldiazomethane as the fluorophore, is still the most widely used for DSP detection, for both research and confirmatory purposes. With this procedure, only OA, DTX1 and DTX2 are directly detected. Ester-derivatives of the latter toxins are not monitored by the procedure, owing to their less polar character or to the esterification of the carboxylic group, and must be hydrolysed prior to derivatization.

In the Lee procedure (1987), after the extraction of the shellfish digestive glands with 80% methanol, a liquid–liquid partition with hexane is carried out in order to remove non-polar lipids. This partition is also included in some mouse bioassay procedures in order to avoid false positive results from possible free fatty acids present eventually in shellfish samples, which are toxic to mice but not to humans (Takagi *et al.*, 1984). We found that low polar DSPs are preferentially solubilized in this solvent. Direct analysis of the hexane shellfish extracts did not reveal the presence of DSPs, but after alkaline hydrolysis of the hexane extract, and depending on the mussel samples, different amounts of OA were found.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Esters of OA from *P. lima* used for the optimization of the hydrolysis conditions were kindly provided by Dr Norte from La Laguna University (Spain). Mussel samples from different production areas of the Galician Rias were provided by the Centro Galego para o Control da Calidade do Medio Mariño. Okadaic acid standard, supplied by Boehringer Mannheim (Barcelona, Spain), was used for standard solution preparations. Adam reagent used for derivatization was supplied by Serva (Comercial Anger, Barcelona, Spain). HPLC-grade solvents were purchased from Merck (Igoda S.A., Barcelona, Spain). Silica cartridges used for clean-up were obtained from Waters (ref. 51900).

DSP sample extraction

The DSP sample extraction was done following the Lee procedure (1987) with slight modifications. For each mussel sample, 1 g of homogenized hepatopancreas was extracted with 4 ml of methanol/water 80:20. After centrifugation, 2.5 ml of the supernatant was extracted twice with 2.5 ml of hexane. The hexane extracts were kept for detection of OA esters after hydrolysis. One millilitre of water was added to the methanolic extract and this layer was extracted twice with 4 ml of chloroform. The final chloroform extract was made up to 10 ml, and an aliquot of 0.5 ml evaporated to dryness and reserved for derivatization with Adam.

Hydrolysis of DSP esters

Hexane extracts were evaporated to dryness with nitrogen, and 0.5 ml of 0.5 N NaOH solution in 90% methanol was added to each extract. The mixture was kept at room temperature, protected against the light, and agitated continuously for 1 hr. After concentrating, 2 ml of 0.125 N HCl was added. The final pH was about 2.5. The solution was extracted three times with 2 ml of chloroform and dried with disodium sulphate. An aliquot of the latter solution was dried under nitrogen and reserved for Adam derivatization.

Adam derivatization

Two-hundred microlitres of 0.2% 9-Adam methanolic solution was added to the dried mussel extracts. The mixture was shaken for 2 min and kept for 1 hr at 40°C protected against the light. The Adam solution was prepared daily from small portions of the reagent kept at -30°C by adding some drops of acetone to facilitate the further solution in methanol, and was then filtered through 0.45 µm.

Clean-up

The clean-up step was identical to that described in the Lee procedure (1987).

HPLC analysis

HPLC analysis followed Lee's method (1987) with slight modifications. The fluorescent esters were separated using a Hewlett-Packard 1050 liquid chromatograph in a Merck Superspher 100-RP18 (4 µm, 250 × 4 mm) column and detected in a Hewlett-Packard 1046 fluorescence detector. The mobile phase was acetonitrile:water 80:20, the column temperature was 35°C and the excitation and emission wavelengths were 365 nm and 412 nm, respectively. The flow rate was 1.1 ml/min.

RESULTS

OA was the major toxin found in the mussels. All the samples contaminated with OA contained other less polar DSPs in higher or lower amounts that were only evident after hydrolysis of the hexane extracts (Table 1). We hypothesize that they belong to the acyl-derivatives group. The highest low-polar DSP concentrations corresponded to the samples containing the highest OA concentrations. In no case did the concentration of the less polar toxins exceed the OA concentration.

Analysis of the mussel extracts that had previously been washed with hexane yielded the same OA concentration before and after the hydrolysis step, showing a preferential and total solubilization of the low-polar DSPs in hexane. No traces of OA were found in the hexane extracts without carrying out the alkaline hydrolysis step (Fig. 3). To determine the best hydrolysis conditions, we tried different times, pH and solvents with OA esters of *P. lima* and subsequently with contaminated mussels. One hour was long enough to reach the highest yield. Different pH values were assayed, and the best yields were obtained by adding 2 ml of 0.125 N HCl to the concentrated alkaline mixture, the final pH being 2.5. Similar tests were obtained using diethylether and chloroform as extraction solvents, so we decided to use the latter, for its better handling properties.

DISCUSSION

The presence of low-polar DSPs has been demonstrated in Spanish mussels. Two different low-polar toxin derivatives that yield the corresponding polar toxins after

hydrolysis have been reported in the literature. These include diolesters in which the esterification was at the carboxylic group (Yasumoto *et al.*, 1987; Hu *et al.*, 1993) and acyl-esters that have a fatty acid attached to the 7-OH group (Yasumoto *et al.*, 1987; Marr *et al.*, 1992). The former have only been described in *P. lima* and *P. concavum*, and have not yet been detected in mussels. Although *P. lima* is present in the Galician Rias in areas close to the mussel production sites, its implication in DSP mussel intoxication has not been demonstrated. Besides, analysis of several *P. lima* strains from Galician waters carried out in our laboratory showed toxin profiles including DTX1 that have never been found in mussels from the Rias, and that would probably have appeared in mussels if *P. lima* were usually included in their diet.

For this reason, and taking into account the finding of acyl-derivatives in Irish mussels (Marr *et al.*, 1992), we hypothesize that the low-polar toxins found solubilized in the hexane layer belong to the latter group. Only the direct analysis of these compounds by LC-MS, as performed by Quilliam's group (1990), followed by gas chromatography to identify the nature of the fatty acids attached to the 7-OH group, can give definitive structural information about these compounds, and about their real contribution to the toxicity.

What is clear is that any procedure (HPLC-FD, HPLC-MS) used to characterize all the DSPs present in shellfish samples should take into account that the hexane layer,

Table 1. Free and esterified okadaic acid detected in mussel samples

Mussel sample	Free OA ($\mu\text{g/g hp}$)	Esterified OA ($\mu\text{g/g hp}$)
1	5.50	0.30
2	4.93	0.50
3	1.41	0.14
4	1.95	0.24
5	1.43	0.09
6	0.91	0.08
7	1.45	0.07
8	9.15	2.33
9	9.28	2.50
10	10.43	2.35
11	7.92	1.50
12	0.48	0.05
13	0.81	0.52
14	0.66	0.05
15	0.39	0.01
16	0.93	0.03
17	1.16	0.05
18	5.53	0.80
19	2.50	0.19
20	3.96	0.18
21	2.87	0.10
22	2.60	0.10
23	2.34	0.14
24	1.73	0.10
25	2.76	0.21
26	3.10	0.25

Free OA represents the amount of toxin detected by Lee's procedure.

Esterified OA is the OA detected in the hexane extracts usually discarded in the extraction procedure.

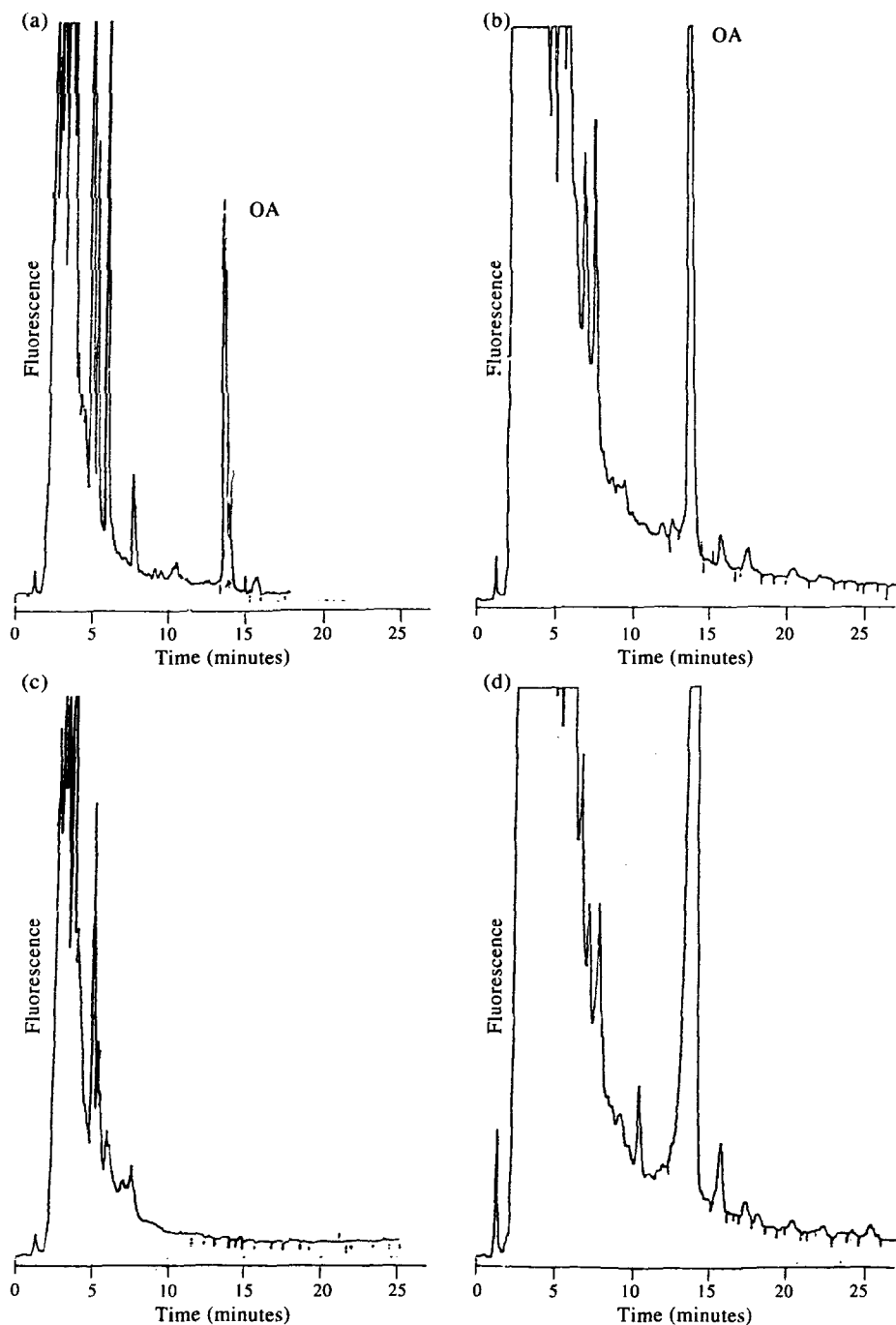


Fig. 3. (a) Chromatogram for OA standard; (b) chromatogram for mussel sample 8 (Table 1) obtained after extraction, derivatization with Adam and clean-up, following Lee's procedure ($V_{inj} = 10 \mu\text{l}$, corresponding to $2.5 \mu\text{g hp}$); (c) chromatogram for hexane extract (sample 8), usually discarded in the Lee extraction procedure, after derivatization with Adam (no traces of DSP toxins); (d) chromatogram for the hexane extract (sample 8) after alkaline hydrolysis and derivatization with Adam ($V_{inj} = 10 \mu\text{l}$, corresponding to $25 \mu\text{g hp}$).

usually discarded, can be very rich in low-polar DSPs. It is worth mentioning that some bioassay procedures used for shellfish monitoring involve hexane washing steps, to avoid false positive results when free fatty acids are present in shellfish samples. Although in the case of the mussel samples analysed in this experiment, the concentration of these compounds only reached high values when they were already highly contaminated with non-acylated DSP toxins, the advantages of the hexane washing step should be reconsidered, taking into account the possible losses of toxins. This step must be avoided when analysing samples of unknown origin and with unknown DSP profiles. It is worth pointing out that acyl-derivatives of DTX1, also called DTX3, have been reported as the major toxins in Japanese scallops; therefore, depending on the shellfish species, their origin, and on different factors affecting metabolic activities, the contribution of acyl-derivatives to DSP toxicity may be more important. It must therefore be taken into account in shellfish monitoring procedures. Some cases of positive results of bioassays showing no traces of DSPs in the chromatograms obtained by the normal procedures could be due to the presence of these compounds, which are not detectable by conventional protocols.

It is suggested that alkaline hydrolysis of the hexane layer obtained after liquid-liquid partition should be included in the HP-FD procedures.

Acknowledgements—We wish to express our gratitude to J. M. Franco, M. Norte and B. Reguera for valuable comments and suggestions, and to T. Wyatt for the English correction of the manuscript. J. Iturbe and L. Fernández provided technical assistance in the experiments, M. I. Reyero and E. Maroño prepared the figures and J. Fernández typed the manuscript.

REFERENCES

- Cádenas, M. L., Norte, M., Arteche, E. and Martín, J. D. (1994) El ácido okadaico como inhibidor selectivo de proteinfosfatasas. Estudios a nivel de músculo liso. In: *Actas de la Tercera Reunión Iberico sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas*, pp. 64–68 (Mariño, J. and Maneiro, J. C., Eds). Santiago de Compostela: Xunta de Galicia.
- Hu, T., de Freitas, A., Doyle, J., Jackson, D., Marr, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M., Walter, J. and Wright, J. L. C. (1993) New DSP derivatives isolated from toxic mussels and the dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*. In: *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, pp. 507–512 (Smayda, T. and Shimizu, Y., Eds). Amsterdam: Elsevier.
- Lee, J. S., Yanagi, T., Kenma, R. and Yasumoto, T. (1987) Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 877–881.
- Lee, J. S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P. and Yasumoto, T. (1989) Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. appl. Phycol.* **1**, 147–152.
- Marr, J. C., Hu, T., Pleasance, S., Quilliam, M. and Wright, J. (1992) Detection of a new 7-O-acyl derivatives of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* **30**, 1621–1630.
- Pleasance, S., Quilliam, M. A., de Freitas, A. S. W., Marr, J. C. and Cembella, A. D. (1990) Ion-spray mass spectrometry of marine toxins II. Analysis of diarrhetic shellfish toxins in plankton by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **4**, 206–213.
- Takagi, T., Hayashi, K. and Itabashi, Y. (1984) Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse assay of diarrhetic shellfish toxin by intraperitoneal injection. *Bull. Jpn. Soc. Scient. Fish.* **50**, 1413–1418.
- Yasumoto, T., Oshima, Y. and Yamaguchi, M. (1978) Occurrence of a new type of toxic shellfish in Japan and chemical properties of the toxin. *Bull. Jpn. Soc. Scient. Fish.* **44**, 1249–1255.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G. and Clardy, J. (1985) Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* **41**, 1019–1025.
- Yasumoto, T., Seino N., Murakami, Y. and Murata, M. (1987) Toxins produced by benthic dinoflagellates. *Biol. Bull.* **172**, 128–131.
- Yasumoto, T., Murata, M., Lee, J. S. and Torigoe, K. (1989) Polyether toxins produced by dinoflagellates. In: *Mycotoxins and Phycotoxins*, pp. 375–382 (Natori, S., Hashimoto, K. and Ueno, T., Eds). Amsterdam: Elsevier.

ARTÍCULO 8

Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels
Mytilus galloprovincialis in Spain

Fernández, M.L., Míguez, A., Moroño, A., Cacho, E., Martínez, A. and Blanco, J. 1998. In: “Harmful Algae”. B.Reguera, J. Blanco, M.L. Fernandez, T. Wyatt. (Eds.).Xunta de Galicia-IOC of Unesco. Santiago de Compostela. pp 449-452.

Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain

RESUMEN

Aunque el AO y la DTX2 son las principales toxinas en los mejillones españoles, la ocurrencia de derivados acilados (ej: DTX3) de baja polaridad ha sido documentada recientemente. Con el objeto de estudiar la cinética de detoxificación de DTX3 en comparación con la de las toxinas precursoras, se recolectaron mejillones en la Ría de Pontevedra inmediatamente después de una proliferación de *Dinophysis*. Los mejillones fueron transferidos a un área libre de células tóxicas, dónde se mantuvieron durante 38 días. Los niveles de AO y DTX2 durante el periodo de detoxificación fueron evaluados por HPLC-FD. La variación temporal de DTX3 fue monitorizada mediante la hidrólisis alcalina de los extractos de hexano de los mejillones y posterior determinación por HPLC-FD de las correspondientes toxinas precursoras obtenidas tras la hidrólisis. La cinética de detoxificación de la DTX3 fue diferente a la correspondiente a las toxinas precursoras. La detoxificación de AO y DTX2 encajó bien cuantitativamente en un modelo de detoxificación de dos compartimentos. En el caso de los derivados acilados, el ajuste fue pobre, poniendo de manifiesto que algunos factores adicionales podrían estar implicados en el proceso. Se muestran el contenido total de DSP, la variación en el perfil de toxinas y las tasas de detoxificación a lo largo del periodo de detoxificación.

DETOXIFICATION OF LOW POLARITY TOXINS (DTX3) FROM MUSSELS *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* IN SPAIN

M.Luisa Fernández*, Aurea Míguez*, Angeles Moroño**, Emiliano Cacho*, Ana Martínez*, and Juan Blanco**

*Laboratorio de Sanidad Exterior de Vigo. European Community Reference Laboratory on Marine Biotoxins, Estación Marítima s/n, 36271 Vigo, SPAIN

**Centro de Investigacions Mariñas (Xunta de Galicia), Apdo. 13, 36600 Vilanova de Arousa, SPAIN

ABSTRACT

Although okadaic acid (OA) and DTX2 are the principal toxins in Spanish mussels, the occurrence of acyl-derivatives (e.g., DTX3) exhibiting low polarity has recently been reported. To study the detoxification kinetics of DTX3 in comparison to those of the parent toxins, mussels were collected in Ría de Pontevedra, Galicia, just after a bloom of *Dinophysis*. Mussels were transferred to an area free of toxic cells, where they were maintained for 38 days. Okadaic acid and DTX2 levels throughout the detoxification period were assessed by HPLC-FD. Temporal variation in DTX3 was monitored by alkaline hydrolysis of the hexane extracts of the mussels and further determination by HPLC-FD of the corresponding parent toxins yielded after hydrolysis. Detoxification kinetics of DTX3 were distinct from those of the parent toxins. Okadaic acid and DTX2 detoxification can be fitted quantitatively by a two-compartment detoxification model. In the case of the acyl-derivatives, the fit is poor, pointing to additional factors involved in the process. Total DSP toxin content, variation in the toxin profile, and detoxification rates throughout the detoxification period are also shown.

INTRODUCTION

Diarrhetic shellfish toxins (DST) comprise three groups of polyether compounds, OA and analogues, pectenotoxins, and yessotoxins [1] that share lipid solubility properties but differ in biological activity. Among these toxins, okadaic acid (OA) and its derivatives are responsible for most DSP outbreaks. They are produced by species of *Dinophysis* and *Prorocentrum* and accumulated by shellfish feeding on these species. The major toxins appearing in shellfish are OA, DTX1, DTX2 and DTX3. DST also include a group of compounds, (7-O-Acyl-derivatives of OA, DTX1 and DTX2), exhibiting low polarity, in which a fatty acyl group is attached through the 7-OH group of the corresponding parent toxin. DTX3 has been found in the digestive gland of Japanese scallops [1] and in mussels from Ireland, Portugal and Spain [2,3,4]. In some toxic episodes, these acylated compounds have proved to be the principal toxins. As they have not been found in dinoflagellates which produce DST they are thought to be products of metabolic activity in the digestive glands of molluscs. Their mammalian toxicity (500 µg/Kg) is considerably lower than that of OA and DTX2 (200 and 160 µg/Kg respectively) [5].

Other ester derivatives of DSP toxins, mainly diol-esters, have been isolated from different strains of *P.lima* and *P.maculosum* [1,6,7]. The esterification is produced at the carboxylic group, which is responsible for the biological activity of the DST, and although in principle their toxic activity is neutralized, their potential toxicity, evident after hydrolysis, cannot be ignored. The implication of benthic

dinoflagellates in DSP outbreaks has been hypothesized but not yet proven, nor have these compounds been detected in wild shellfish. The two groups of derivatives cannot be directly detected by liquid chromatography with fluorimetric detection (HPLC-FD) as 9-anthryldiazometane (ADAM) derivatives, and must be hydrolysed before derivatization. After alkaline hydrolysis, both groups yield the same parent DSP toxins, therefore they cannot be differentiated with this procedure.

In the Galician Rías, DSP toxicity has led to considerable economic losses to the mussel industry. *Dinophysis acuminata* and *Dinophysis acuta* are the main species responsible for toxic episodes. These have been shown to produce OA and DTX2 [8]. The presence of diol-esters of DSP toxins in *Dinophysis* has not been investigated due to the difficulties in culturing these species, but the possibility cannot be discarded. However, studies on DSP toxins uptake/elimination kinetics are scarce, especially those dealing with DTX3, therefore it is difficult to make short- and long-term predictions that would allow the establishment of mitigation strategies.

To improve understanding of DST decontamination processes, especially for DTX3, highly toxic mussels from a growing site in the Ría de Pontevedra, recently affected by a toxic bloom and with high DSP toxins levels, were transferred to an unaffected area. The levels of OA, DTX2 and other derivatives were monitored during a 38 day decontamination period.

MATERIALS AND METHODS

Materials

A sample of 80 mussels collected in October 1995, just after a bloom of *Dinophysis* in Ría of Pontevedra, was placed in a tank with running unfiltered seawater. Mussel samples for DSP toxin analysis were taken twice a week during the first two weeks and once a week during the rest of the 38 days experiment. OA standard was purchased from the Institute for Marine Biosciences, Canada. The DTX2 standard was a gift from K. James (Cork RTC, Ireland). The ADAM reagent used for derivatization was supplied by Serva. HPLC-grade solvents were purchased from Merck. Silica cartridges used for clean-up were obtained from Waters.

Diarrhetic Shellfish Toxin Extraction

The extraction was done following the Lee procedure [9] with slight modifications. For each mussel sample, two replicates of 1 g of homogenized digestive gland were extracted with 4 ml of methanol:water (80:20). After centrifugation, 2.5 ml of the supernatant were extracted twice with 2.5 ml of hexane. The hexane extracts were kept

for detection of low polar derivatives of OA and DTX2 after hydrolysis. One ml of water was added to the methanolic extract and this layer was extracted twice with 4 ml of chloroform. The final chloroform extract was made up to 10 ml and a 0.5ml aliquot was evaporated to dryness and reserved for derivatization with 9-ADAM.

Hydrolysis of low polar derivatives

The procedure followed was that of Fernández et al [4]. Hexane extracts were evaporated to dryness with nitrogen and 0.5 ml of a 0.5 N solution of NaOH in 90% methanol was added to each extract. The mixture was kept at room temperature, protected from the light, and agitated continuously for 1 h. After concentrating, 2ml of 0.125 N HCl was added. The solution was extracted twice with 2 ml of chloroform and dried with disodium sulphate. An aliquot of the latter solution was dried under nitrogen and reserved for ADAM derivatization.

ADAM derivatization, clean-up and HPLC analysis.

200 µl of 0.2% 9-ADAM methanolic solution was added to the mussel extracts. The mixture was shaken for two minutes and kept at 40°C for one hour, protected from light. The ADAM solution was prepared daily from small portions of the reagent kept at -20°C by adding a few drops of acetone to facilitate the further dissolution in methanol, and was then filtered through a 0.45 µm filter. The clean-up step was identical to that described in the Lee procedure [9].

HPLC analysis were carried out following the Lee procedure [9] with slight modifications. The fluorescent esters were separated using a Hewlett Packard 1050 Liquid Chromatograph on a Merck Superspher 100-RP 18 (4 µm, 250 x 4) column and detected with a Hewlett Packard 1046 fluorescence detector. The mobile phase was acetonitrile:water (80:20), the column temperature was 35°C, and the excitation and emission wavelengths were 365nm and 412 nm, respectively. The mobile phase flow rate was 1.1 ml/min.

Estimation of detoxification and acylation rates

Detoxification and acylation rates were estimated by fitting two dual-compartment detoxification models. The first model, which also included the acylation of OA and DTX2, was established for each group of toxins as follows:

$$\begin{aligned} d\text{Tox}_1 / dt &= -DT_1 \cdot \text{Tox}_1 - T \cdot \text{Tox}_1 - A_1 \cdot \text{Tox}_1 \\ d\text{Tox}_2 / dt &= -DT_2 \cdot \text{Tox}_2 + T \cdot \text{Tox}_1 - A_2 \cdot \text{Tox}_2 \\ d\text{Acyl}_1 / dt &= -DTA_1 \cdot \text{Acyl}_1 + A_1 \cdot \text{Tox}_1 - TA \cdot \text{Acyl}_1 \\ d\text{Acyl}_2 / dt &= -DTA_2 \cdot \text{Acyl}_2 + A_2 \cdot \text{Tox}_2 + TA \cdot \text{Acyl}_1 \end{aligned}$$

Where:

Tox: OA or DTX2 concentration.

Acyl: OA or DTX2 derivatives concentration.

DT: Detoxification rate of OA or DTX2.

DTA: Detoxification rate of OA or DTX2 derivatives.

T: Transfer rate of polar toxins from compartment 1 to compartment 2.

TA: Transfer rate of low polar derivatives from compartment 1 to compartment 2.

A: Acylation rate of original toxins.

The numerical subindices indicate the compartment.

The second model was established without including the acylation process, so that the two principal toxins and the corresponding derivatives are independent, each with its own dynamics. The fitting of the models was carried out by a least-squares method.

RESULTS

The principal DSP toxins found in the mussels were OA and DTX2, the initial concentrations (mean value) being 12.2 µg/g of digestive gland (g dg) and 4.3 µg/g dg, respectively. Quantification of DTX2 was carried out assuming that the fluorescence response of DTX2 esters was equal to that of OA esters.

Low polarity derivatives of OA and DTX2 were also present, although in small amounts in comparison with the parent toxins. The OA and DTX2 yielded after alkaline hydrolysis of the latter compounds represented a small proportion of the total toxin content: 7.4 % in the case of OA derivatives, and only 1.9 % in the case of DTX2 derivatives.

The OA and DTX2 concentrations in mussels showed an 85 % and a 70 % decrease, respectively, during the 38 d decontamination period. The remaining toxin at the end of the experiment was 1.7 µg OA /g dg and 1.2 µg DTX2 /g dg.

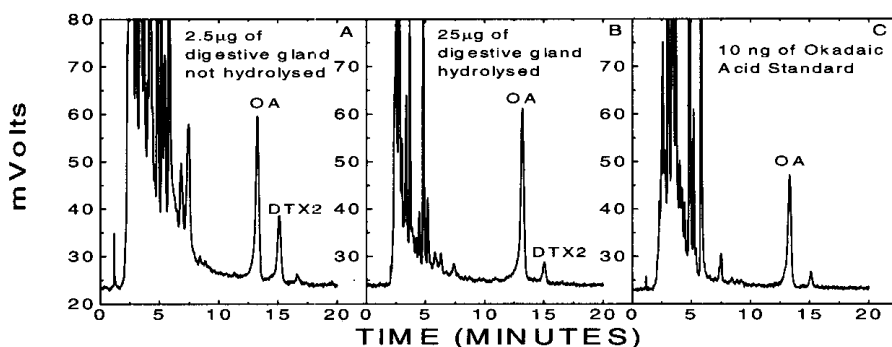


Fig.1. Chromatograms corresponding to a raw sample(A), a processed sample to quantify the acyl-derivatives (B) and an okadaic acid standard (C)

The ratio OA/DTX2 was not constant during the detoxification period (Fig.2); DTX2 became more abundant as detoxification progressed. The same trend can be observed in the ratio of the correspondent low polarity derivatives. The ratio of each low polarity derivative to its parent toxin also varied with time, but this variation was far less linear than the previous ratios. (Fig.2). They showed an initial decrease (an increase of the polar toxin in relation to the low polarity derivative) followed by an increase and a subsequent small decrease.

Fitting a one-compartment model to the toxin elimination data, gave a good quantitative concordance for OA and DTX2 but not for their low polar derivatives. The

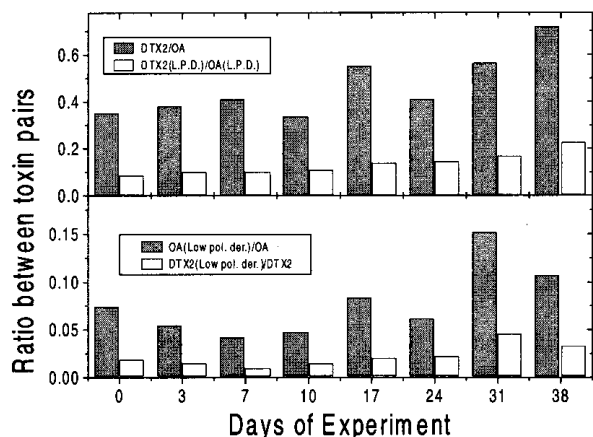


Fig.2. Change of the ratios between toxins during 38 days of detoxification

elimination of the latter toxins was rapid at the beginning but decreased considerably with time so that, reaching a certain level, the concentration remained practically constant and even increased slightly by the middle of the experiment.

Both, OA and DTX2 showed a progressive decrease in concentration that corresponded rather well with a constant rate. However, there was a qualitative discrepancy between the observed data and the model because detoxification was rapid at the beginning but progressively slowed down. A two-compartment model gave a better fit to the toxin kinetics observed (Fig.3). In both models, the

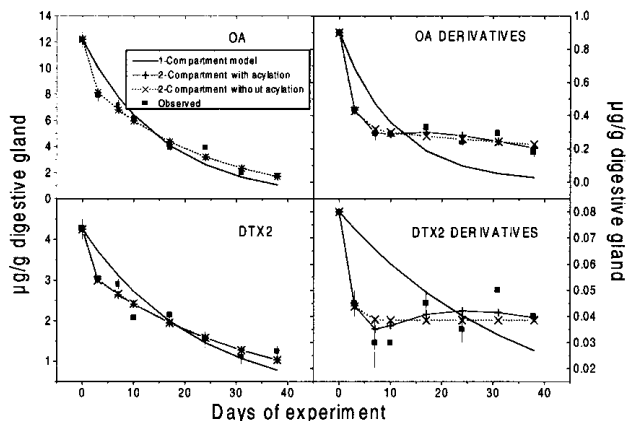


Fig.3. Fit of the one and two-compartment models (with and without including acylation) to the observed data.

estimated detoxification rate for DTX2 is lower than that estimated for OA. A similar response was detected for the corresponding derivatives.

When bioconversion rates of OA and DTX2 for the low polarity derivatives were included in the two-compartment models, the fit to the observed data improved considerably, especially in the case of OA derivatives. The estimated detoxification rate obtained for DTX2 in the first compartment was extremely low, whereas that for its derivatives was extremely high. This led us to suspect that there is a certain degree of inaccuracy in the determination of those rates, probably due to errors in the estimation of the DTX2 derivatives, which were present in a very low

Table I. Estimated values of the parameters included in the two-compartment models

	Okadaic Acid	DTX2	Acyl-derivatives of OA	Acyl-derivatives of DTX2
Initial toxin percentage in the first compartment	100	100	100	100
Detoxification rate of Compartment I (day ⁻¹)	0.237	0.226	0.131	0.081
Detoxification rate of Compartment II (day ⁻¹)	0.043	0.030	0.009	0
Transfer rate from Comp.I to Comp.II (day ⁻¹)	0.762	0.773	0.297	0.426

concentration. This inaccuracy in the determination of the rates associated with DTX2 derivatives is supported by the fact that when the residuals of the fitting to a two

Table II. Estimated values of the parameters included in the two-compartment models with acylation

	Okadaic Acid	DTX2	Acyl-derivatives of OA	Acyl-derivatives of DTX2
Initial toxin percentage in the first compartment	100	63	100	63
Detoxification rate of Compartment I (day ⁻¹)	0.237	0.028	0.207	0.675
Detoxification rate of Compartment II (day ⁻¹)	0.0408	0.0281	0.0575	0.0300
Acylation rate (day ⁻¹)	0.00269	0.00152		
Transfer rate from Comp.I to Comp.II (day ⁻¹)	0.762	0.594	0.223	0

compartment model (without taking into account any bioconversion) are compared with the concentration of the derivatives (Fig.4) an evident inverse relationship is found. This relationship is substantially altered in one of the DTX2 derivatives data. We have checked the possibility of transformation between OA and DTX2 by means of other models. All those models gave a poorer fit to the actual data than their equivalents which did not include the possibility of such a transformation. Therefore, it does not seem to exist in mussels.

DISCUSSION

The contribution of the low polarity derivatives to the total toxin content of the mussels was very low in comparison to toxic episodes previously described in Japanese scallops and in Portuguese mussels [1,3]. In addition to inter-species variations in metabolic pathways, the most likely reason is that in our study the contamination

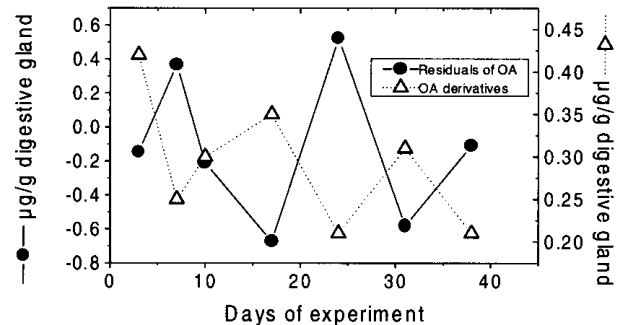


Fig.4. Inverse relationship observed between the residuals of a two-compartment model of OA and the corresponding acyl-derivatives

took place during a short period before our experiment. Therefore, only a small fraction of the toxins had been transformed and only small differences had been produced by their differences in detoxification rates.

The detoxification kinetics are quite different between the polar toxins and their low polarity derivatives pointing to important differences in the mechanism involved. It is clear that detoxification rates were not constant, showing a time course previously described as biphasic (fast and slow) by Shumway [9], and Marcaillou-Le Baut et al.[10]. The relative lack of fit -even of a two-compartment model- of the low polarity derivatives shows that there are more factors involved in this process. The relationship between the residual deviations of the model from the data of OA and DTX2 and the actual concentration of the low polarity derivatives suggests that the additional process involved is acylation (or a similar bioconversion). Yet the inclusion of this process in the model produces some odd estimates of the detoxification rates that could be produced by inaccuracy of the estimates and/or by an inadequate model structure. The first possibility is supported by the previously described relationship with the residuals. The second one also seems reasonable, because other mechanisms can account for the kinetics of the derivatives. A possible mechanism whereby it is not necessary to include very high initial detoxification rates might be the following: mussels assimilate other DSP toxin such as diol-esters and DTX4 derivatives from phytoplankton cells, those compounds are quickly hydrolysed to OA and DTX2 by esterases in the mussels digestive glands as suggested by Quilliam et al.[12] or by those liberated from the plankton cells, while, simultaneously, a slow acylation occurs. This hypothesis cannot be verified without carrying out LC-MS analysis, but it would be very interesting to check the presence of these DSP toxins derivatives in *Dinophysis*, as they exist in other DSP toxin producers such as *P.lima*.

Additional facts related to the decontamination process are worth mentioning: the slower detoxification rate of DTX2 and derivatives in relation to OA and its derivatives, and also the slower decontamination rate of the derivatives in relation to the rate of the parent toxins. The first suggests that toxic episodes in which DTX2 is involved last longer than those in which OA is the responsible toxin. The second implies that when acyl-derivatives are produced in large quantities, detoxification will be prolonged. A number of processes might account for the low detoxification rate of the acyl-derivatives. A possible mechanism could be that acylation releases the toxins from the ligands on the wall cells of the digestive tubules, allowing their transfer to the reserve cells of the digestive gland. These cells have a much lower turnover than the wall cells that are quickly eliminated as metabolic faecal losses [12].

Finally, although OA and DTX2 concentrations in mussels showed a 85% and 70 % decrease, respectively, during a detoxification period of 38 days, the remaining

toxicity at the end of the experiment was considerable. Residual DSP toxin levels might therefore persist for a long time, and sometimes below the detection limit of the current regulatory testing methods (mouse bioassay). A risk of chronic exposure to low amounts of these toxins should be considered. This might involve a human health risk, if the tumour promotion activity of the DSP toxins is taken into account.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was partially funded by CICYT projects MAR-1791 and ALI95-1012-CO5-02, and by the Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura (Xunta de Galicia).

REFERENCES

1. T.Yasumoto, M. Murata, J.S. Lee, K.Torigoe, in: *Mycotoxins and Phycotoxins*, Natori S., Hashimoto K., Ueno Y, eds. (Elsevier, Amsterdam), pp 375-382 (1989).
2. J.C. Marr, T. Hu, S. Pleasance, M.A. Quilliam, J.L.C. Wright, *Toxicon* **30**, 1621-30 (1992).
3. Vale P., Sampayo M.A., in: IX IUPAC Symposium on mycotoxins and phycotoxins (Abstract), Miraglia, M., Brera, C., Omori, R., eds., (ISS, Roma) p274 (1997)
4. M.L. Fernández, A. Míguez, E. Cacho, A. Martínez, *Toxicon* **34**, 381-387 (1996).
5. T. Yanagi, M. Murata, K. Torigoe, T. Yasumoto, *Agri.Biol.Chem.*, **53**, 525-529 (1989).
6. M. Norte, A. Padilla, J.J. Fernández, M.L. Souto, *Tetrahedron* **50**, 9175-9180 (1994).
7. T. Hu, J. Marr, A.S.W. De Freitas, M.A. Quilliam, J.A. Walter, J.L.C. Wright, S. Pleasance, *J.Nat.Prod.*, **55**, 1631-1637 (1992).
8. J. Blanco, M. Fernández, J. Mariño, B. Reguera, A. Míguez, J. Maneiro, E.Cacho, A. Martínez, in: *Harmful Marine Algal Blooms*, Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P., Marcaillou, C., eds. (Lavoisier, Intercept Ltd, Paris), pp.777-782 (1995)
9. J.S. Lee, T. Yanagi, R. Kenma, T. Yasumoto, *Agric. Biol. Chem.* **51**, 877-881 (1987).
9. S.E. Shumway, *Journal of the World Aquaculture Society* **21**(2), 65-104 (1990).
10. C. Marcaillou-Lebaut, B. Bardin, M. Bardouil, M. Bohec, L. Le Dean, P. Masselin, P. Truquet, in: *Toxic Phytoplankton Blooms at the Sea*, Smayda T.J, Shimizu, Y. eds. (Elsevier, Amsterdam) pp531-535 (1993).
11. M.A. Quilliam, W. Hardstaff, N. Ishida, J. McLachan, A. Reeves, N. Ross, A. Windust, in: *Harmful and Toxic Algal Blooms*, Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, eds., (IOC of UNESCO), pp289-292 (1996).
12. A.J.S. Hawkins, B.L. Bayne, *Mar. Biol.* **82**:233-240 (1984).

ARTÍCULO 9

Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels
Mytilus galloprovincialis during a toxic episode caused by
Dinophysis acuminata.

Moroño, A., Arévalo, F., **Fernández, M.L.**, Maneiro, J., Pazos, Y., Salgado, C.
and Blanco, J. 2003. Aquatic Toxicology 62, 269-280

Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la evolución de varios episodios del organismo productor de DSP, *Dinophysis acuminata* y la correspondiente cinética de acumulación y pérdida de toxinas en mejillones *Mytilus galloprovincialis*. Para ello se recogieron muestras de mejillones y agua de mar en una batea de la Ría de Vigo con una frecuencia de 2-3 veces por semana. El contenido en toxinas DSP en los mejillones y en el agua fue analizado por HPLC-FD y el fitoplancton, en muestras sedimentadas, fue cuantificado mediante microscopia inversa. En las muestras de plancton, que estuvieron constituidas principalmente por células de *D. acuminata*, se detectaron AO y derivados conjugados del mismo (AO, CF) que fueron determinados por hidrólisis enzimática. La toxina acumulada en los mejillones estuvo mayoritariamente presente en forma de AO, alcanzándose un máximo de $10.1 \mu\text{g AO g}^{-1}$ en la glándula digestiva en 16 días, y reduciéndose por debajo del nivel máximo permitido (aproximadamente $2 \mu\text{g AO g}^{-1}$) en 45 días. Las formas conjugadas de baja polaridad (LPFC) estimadas mediante su extracción con hexano, representaron el 6.2 % del contenido total en toxinas de los mejillones. Para cuantificar las tasas de los procesos implicados en la acumulación, transformación y pérdida de las toxinas, se diseñaron e implantaron dos modelos dinámicos, uno de ellos de un compartimento y otro de dos compartimentos, incluyendo AO y sus formas conjugadas como variables. El modelo de un compartimento proporcionó un buen ajuste con los datos reales de AO y sus formas conjugadas ($r^2 = 0.92$ y $r^2 = 0.94$ respectivamente). El modelo de dos compartimentos no ajustó los datos de manera significativamente mejor que el modelo de un compartimento ($r^2 = 0.93$ y $r^2 = 0.95$ respectivamente). Se estimaron tasas de hidrólisis elevadas para la mayor parte de los derivados conjugados del AO, lo que significa que la mayor parte de estas formas provienen del plancton ingerido. Las bajas tasas de acilación estimadas apoyan la hipótesis previa y sugieren que la formación de LPFC por acilación directa del AO es de pequeña importancia en *M. galloprovincialis*. Sólo en aquellos casos en los que el periodo de intoxicación es muy largo, los derivados acilados pueden llegar a ser importantes, dado que parece que se acumulan por largo tiempo en los mejillones, como sugieren las bajas tasas de hidrólisis y depuración estimadas por el modelo.

Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*

A. Morono^{a,*}, F. Arévalo^a, M.L. Fernández^b, J. Maneiro^a, Y. Pazos^a,
C. Salgado^a, J. Blanco^c

^a Centro de Control do Medio Mariño (Xunta de Galicia), Peirao de Vilaxoán s/n, Vilagarcía de Arousa 36611, Pontevedra, Spain

^b Laboratorio de Sanidad Exterior de Vigo, European Community Reference Laboratory on Marine Biotoxins, Estación Marítima s/n, 36271 Vigo, Spain

^c Centro de Investigacións Mariñas (Xunta de Galicia), Apto. 13, 36620 Vilanova de Arousa, Pontevedra, Spain

Received 29 November 2001; received in revised form 21 June 2002; accepted 3 July 2002

Abstract

The time course of several outbreaks of the diarrhetic shellfish poisoning (DSP) producer *Dinophysis acuminata* and the consequent kinetic of accumulation and loss of toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* feeding on them was studied. Samples of mussels and seawater were frequently (2–3 times a week) collected from a raft in the Ría de Vigo. DSP toxins content of mussels and water was analyzed by HPLC-FD and phytoplankton was quantified in an inverted light microscope. Only okadaic acid (OA) and some of its conjugated forms (OA CF), estimated by enzymatic hydrolysis, were found in the plankton samples obtained, comprised mainly of *D. acuminata* cells. The main accumulated form in mussels was OA reaching a maximum of $10.1 \mu\text{g OA g}^{-1}$ in the digestive gland (d.g.) in 16 days, falling below the quarantine level (ca. $2 \mu\text{g OA g}^{-1}$ d.g.) by 45 days. The low polarity conjugated forms (LPCF), estimated by hexane extraction, accounted for 6.2% of the total toxin burden of the mussels. To quantify the rates of the processes involved in the accumulation, transformation and loss of the toxins, two dynamic models, a one-compartment and a two-compartment, including OA and its conjugated forms as variables were designed and implemented. The one-compartment model provided a good fit to the OA and LPCF actual data ($r^2 = 0.92$ and $r^2 = 0.94$, respectively). The two-compartment model did not fit the data markedly better than its one-compartment counterpart ($r^2 = 0.93$ and $r^2 = 0.95$, for OA and LPCF, respectively). High hydrolysis rates were estimated for most of the OA CF, which means that these forms came largely from the ingested plankton. The low estimated acylation rates support the previous point and suggest that the formation of LPCF by direct acylation of the OA is of little importance in *M. galloprovincialis*. Only in cases where the intoxication period is very long, can the formed acyl-derivatives be important, because they seem to accumulate for a long time in the mussels, as suggested by the low hydrolysis and depuration rates estimated from model fitting.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +34-986-512-320; fax: +34-986-512-300

E-mail address: amoronho@ccmm.cesga.es (A. Morono).

Keywords: Accumulation; *Dinophysis acuminata*; DSP toxins; Models; *Mytilus galloprovincialis*; Transformation

1. Introduction

The accumulation of phycotoxins is one of the most critical problems in bivalve aquaculture. To date paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins, amnesic shellfish poisoning (ASP) toxins and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins are considered to be the main phycotoxin groups. Of these, DSP includes some of the toxins with the lowest acute effect, okadaic acid (OA) and its derivatives, as they only seem to produce severe gastrointestinal disorders. However, in many bivalve-producing areas, they have a far-reaching economic impact as their appearance leads to the imposition of long bans on the culture harvest (Masselin et al., 1992; Reguera et al., 1993; Carmody et al., 1995; McMahon et al., 1998). The phytoplankton cells that produce and contain the toxins are ingested by bivalves and the toxins are accumulated, transformed and eliminated. A knowledge of all these processes is of the utmost importance for being able to predict the time course of a toxic episode and therefore, to minimize its consequences.

The toxins produced and the cellular toxins content are species-specific. They also have a noticeable intra-specific variation, depending on strains and physiological conditions (Lee et al., 1989; Subba Rao et al., 1993; Andersen et al., 1996; Johansson et al., 1996; Sato et al., 1996; Suzuki et al., 1997; Fernández et al., 2001). Most of the species belonging to the genus *Dinophysis*, the most important DSP toxins producer, contain mainly OA and its derivatives, dinophysistoxin-1 (DTX1) and dinophysistoxin-2 (DTX2) (Cembella, 1989; Lee et al., 1989; Andersen et al., 1996; Johansson et al., 1996; Suzuki et al., 1997; James et al., 1998; Fernández et al., 2001). A number of conjugated forms of OA, DTX1 and DTX2 have been discovered and a wide variety appear to exist, mainly because the original toxins

may combine with a great number of substances. Several derivatives such as diol-esters or DTX4-type compounds have been detected in *Prorocentrum lima* and *P. maculosum*, two benthic dinoflagellates that produce DSP toxins (Yasumoto et al., 1989; Hu et al., 1992, 1993; Quilliam et al., 1996), but they have not been found in bivalves or in pelagic plankton. Acyl-derivatives of the DTX3-type, in which saturated or unsaturated fatty acids are attached through the 7-OH group, have been reported in the digestive glands (d.g.) of toxic bivalves (Yasumoto et al., 1985; Marr et al., 1992; Fernández et al., 1996; Suzuki et al., 1999; Vale and Sampayo, 1999). They have never been found in phytoplankton and, based on current knowledge, they would seem to originate from the transformation of OA and analogues in the bivalves (Yasumoto et al., 1989; Lee et al., 1989; Suzuki et al., 1999; Suzuki and Mitsuya, 2001). The polarity of DTX4 type compounds is considerably higher than that of OA. Diol-esters, on the other hand, are slightly less polar than OA and the acyl-derivatives usually have low polarity and, for the most part, can be separated from the free-acid forms by extraction with hexane (Suzuki et al., 1999; Suzuki and Mitsuya, 2001; Vale, 1999).

Once the toxins are ingested, they can be accumulated or transformed. To date only three possible transformations have been considered: hydrolysis and oxidation of conjugated forms and acylation of the free-acid forms. Acylation has been demonstrated in bivalves by Suzuki et al. (1999), Suzuki and Mitsuya (2001). Hydrolysis has been suggested in bivalves by Fernández et al. (1998) and demonstrated in homogenates of the DSP-producer dinoflagellate *P. lima* (Quilliam et al., 1996; Windust et al., 1997, 2000). Oxidation of OA diol-ester has been observed by Windust et al. (1997) in *Thalassiosira weissflogii* but only when the diatom cells are intact (Windust et al., 2000).

After ingestion/digestion of the *Dinophysis* cells, the toxins are assimilated, in their original or modified forms, and later eliminated following a type of kinetics that can usually be classified as monophasic or biphasic and described by one- or two-compartment models (Silvert and Cembella, 1995; Blanco et al., 1997, 1999; Morono et al., 1998; Silvert et al., 1998).

Direct measurements of the previously discussed processes are very difficult or even impossible to obtain, so they must be estimated. The first attempts in this direction, with DSP toxins, were carried out by Blanco et al. (1995), Fernández et al. (1998) using an assimilation–depuration and a depuration–transformation model, respectively. In the first case, a one-compartment model, (in which all the accumulated toxins are detoxified at the same rate) was enough to explain the DSP toxins accumulation in mussels, based in bans data. In the second case, Fernández et al. (1998) observed that it is possible to obtain a good fit to OA and DTX2 data with a one-compartment model, although the fit is better with a two-compartment model (in which the accumulated toxins are supposed to be shared out in two compartments with different kinetics of detoxification). However, in the same study, for OA and DTX2 low polarity derivatives it was not possible to obtain a good fit with a one-compartment model and the estimated detoxification rates for a two-compartment model were unusually high. These authors attributed these odd estimates to inadequate structure of the model or, more likely, to the presence of conjugated forms of OA—diol-esters—in *Dinophysis* cells. In this work, the same approach is used, but taking into account the suggestions of Fernández et al. (1998) on the probable existence of a low polar fraction of DSP toxins in the plankton. The concentration of DSP toxins in plankton and mussels during several outbreaks of *Dinophysis acuminata* was measured. A set of models was implemented and fitted to the resulting data, in order to estimate the importance of the processes involved in the assimilation, transformation and elimination of the toxins, and to be able to predict the duration of the episodes.

2. Materials and methods

2.1. Sampling and phytoplankton count

The water column is sampled weekly at 57 points along the Galician coast by the monitoring program (Centro de Control do Medio Mariño, Mariño et al., 1998). In addition to this, from September to November of 1998, mussels and seawater, from a raft located in the inner part of the Ría de Vigo (Fig. 1), were sampled. The samples were taken three times a week during the first month and twice a week during the subsequent 2 months, when toxin changes due to detoxification were much smaller.

During the first 3 days one integrated sample of the top 15 m of the water column was collected with a hose (Lindhal, 1986). Phytoplankton concentration of these samples was quantified by counting aliquots of 25 ml using the Utermöhl technique. After the 4th day of sampling, a second water sample was collected by means of several plankton net hauls (mesh size: 10 µm). This concentrated sample was split into two aliquots: a 25 ml one, processed as before, and the remainder, which was processed and analyzed to quantify the toxin content by HPLC-FD.

2.2. Toxin extraction from phytoplankton samples

Phytoplankton samples were analyzed following both the boiling and the freeze–thaw extraction procedures developed by Quilliam et al. (1996).

Two aliquots of each sample were transferred to plastic centrifuge tubes and centrifuged for 10 min at 4500 rpm. The supernatants were decanted without disturbing the cell pellets. A pellet of cells from each sample was processed following the boiling extraction procedure and the other using the freeze–thaw procedure. In the boiling procedure the enzymes of *Dinophysis* cells were inactivated preventing the hydrolysis of potentially present conjugated forms of OA. In the freeze–thaw procedure the enzymatic hydrolysis of the conjugated forms of OA was allowed.

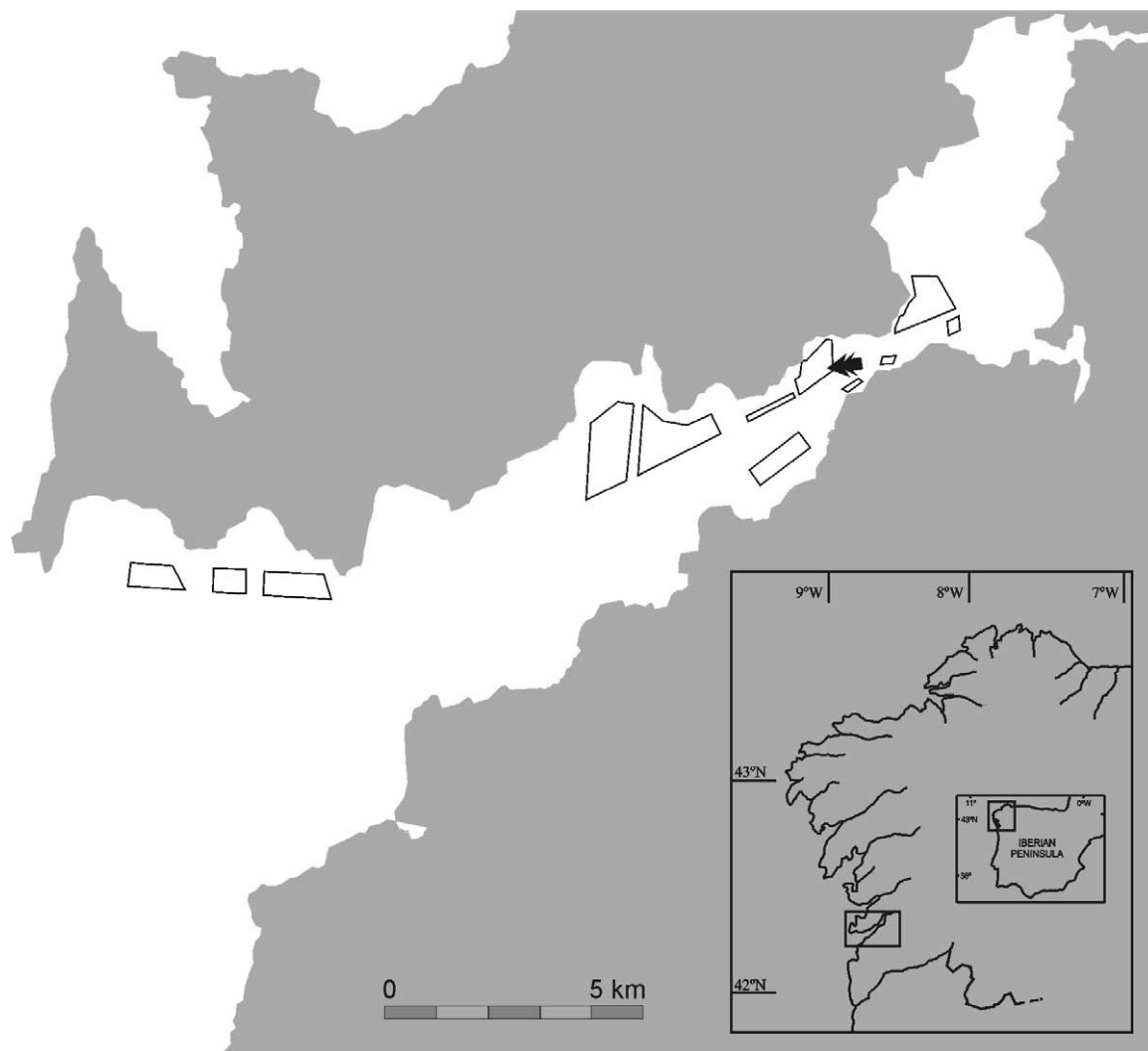


Fig. 1. Map of the Ría de Vigo (NW, Spain). The black arrow shows the location of the raft where mussels and seawater were periodically sampled throughout a *D. acuminata* event. The blank geometric figures are groups of rafts.

2.3. Toxin extraction from mussel samples

The DSP toxin extraction from mussel samples, ADAM derivatization and clean-up were done following the [Lee et al. \(1987\)](#) procedure. Hydrolysis was carried out following the procedure developed by [Fernández et al. \(1996\)](#).

2.4. HPLC analysis

HPLC analysis of phytoplankton and mussels were performed following the method described by [Lee et al. \(1987\)](#) with slight modifications. The fluorescent esters were separated using a Waters 600-E liquid chromatographic system with a

Merck LiChrosphere100-RP18 (5 μm , 125×4 mm) column and detected in a Waters 474 scanning fluorescence detector. The mobile phase was acetonitrile:water (80:20), the column temperature was 25 °C and the excitation and emission wavelengths were 365 and 412 nm, respectively. Flow rate was 0.8 ml min⁻¹.

The OA standard was supplied by NRC-Canada. The 9-anthryldiazomethane (ADAM) reagent used for derivatization was supplied by Boehringer Ingelheim. The HPLC grade solvents were purchased from Merck. The SPE Silica cartridges used for clean-up were obtained from Waters.

2.5. Models

The models were implemented using Matlab and Matlab Simulink. The optimum fit to the data was obtained minimizing chi-square (χ^2) by changing the parameters of the different models using the Matlab Optimization Toolbox.

Filtration rate and assimilation efficiency were considered to be constant and their numerical values were taken from the results obtained in the Ría de Arousa for *Mytilus galloprovincialis* (Navarro et al., 1991). The ingestion rate was not included in the model because it is considered to be equivalent to the filtration rate in Galician Rías, due to the fact that the concentration of seston is usually below the level of pseudofaeces production (5 mg l⁻¹, Widdows et al., 1979; Navarro et al., 1991). The detoxification rates (OA and OA CF), acylation rates, hydrolysis rate and transfer rates were estimated by fitting the model to the real DSP toxins data. In addition, the toxin content per *D. acuminata* cell, for the first day of *D. acuminata* detection and for the three subsequent sampling days, were estimated by the fit of the model.

3. Results

3.1. The *Dinophysis acuminata* bloom

In late August 1998, a *D. acuminata* bloom built up in the Galician Rías with strong southerly winds, which generated an oceanographic situa-

tion of downwelling. This bloom was first detected on August 31st at most of the 57 stations sampled by the monitoring program of the Galician coast, with a concentration of 1320 cells l⁻¹ in the station closest to the selected mussel raft. Three days later, a maximum of 5240 cells l⁻¹ was detected on the same sampling station, decreasing afterwards to 40 cells l⁻¹ in 14 days (Fig. 2). *D. acuminata* persisted at this low concentration for 3 months with a weak increase to 240 cells l⁻¹ in early October and to 480 cells l⁻¹ in early November (Fig. 2).

3.2. DSP toxins in mussels and plankton

OA was the main toxin found in the mussels (from 0.18 to 10.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ of d.g.). In addition to OA, low polarity (hexane-soluble) conjugated forms (LPCF)—very likely DTX3 type compounds—were also found, accounting for a maximum of 6.2% of all accumulated toxins (between undetected and 0.31 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.g.). The ratio LPCF/OA varied with time (Fig. 3), showing an initial decrease followed by a subsequent increase to levels higher than those detected at the beginning.

Part of the OA in the plankton was present as conjugated forms (very likely diol-esters or DTX4-type compounds), as revealed by the increase in the OA yield after allowing the enzymatic hydrolysis (freeze-thaw procedure) of the plankton samples. The OA toxin content per *D. acuminata* cell varied between not detected and 11.3 pg cell⁻¹ and its conjugated forms between not detected and

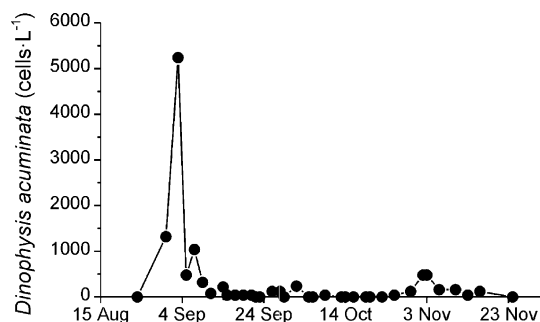


Fig. 2. Temporal evolution of the concentration of *D. acuminata* sampled on the experimental raft (Ría de Vigo) in 1998.

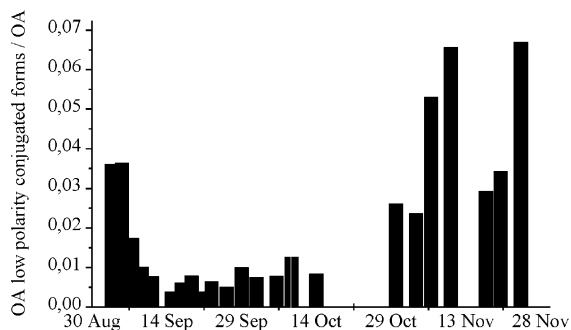


Fig. 3. Temporal evolution of the OA LPCFs and OA ratio in

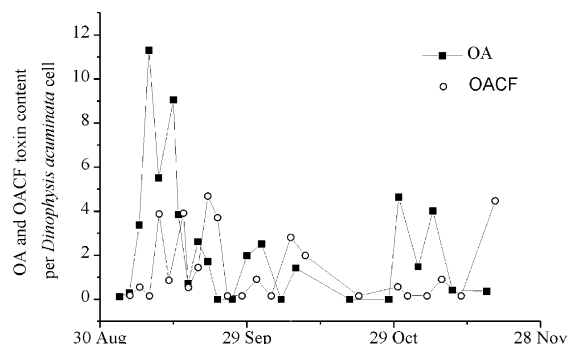


Fig. 4. Content of OA and OA conjugated forms (obtained from the difference between the freeze–thaw and the boiling procedure) in *D. acuminata* analyzed by HPLC from net samples.

5.2 pg cell⁻¹ (Fig. 4). The OA conjugated forms represented between 12 and 100% of the total toxin content. The maximum total toxin content per cell found was 15.6 pg.

3.3. Models

A one-compartment and a two-compartment model were fitted to the actual DSP toxins data (Fig. 5). The first model assumes that all toxin in the mussels detoxify at a constant rate (each compound)

$$\frac{dOA}{dt} = (NT_{OA}FAE) - OAD_{OA} - OAA + CFH$$

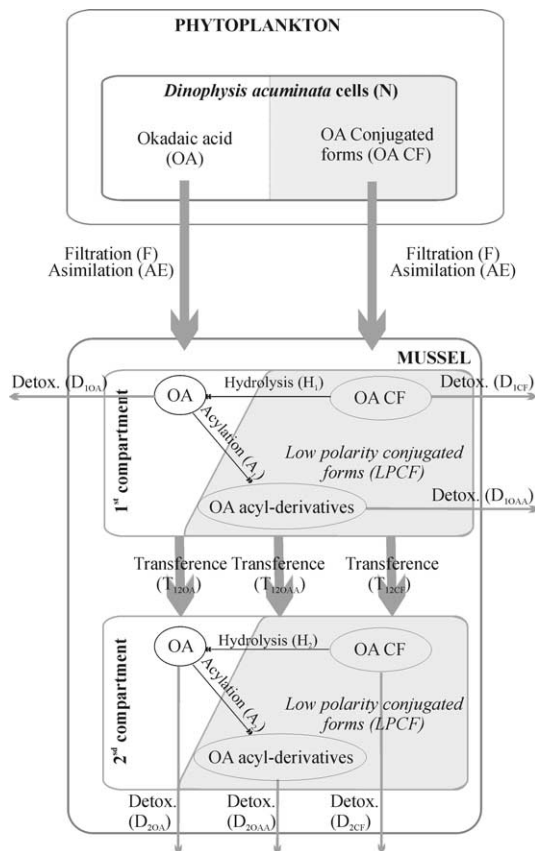


Fig. 5. Schematic representation of the two-compartment model, in which the one-compartment model is included in the first compartment (when there is no transference of toxins from the first to the second compartment).

$$\frac{dCF}{dt} = (NT_{CF}FAE) - CF D_{CF} - CFH$$

$$\frac{dOAA}{dt} = OAA - OAAD_{OAA}$$

$$\frac{dLPCF}{dt} = \frac{dCF}{dt} + \frac{dOAA}{dt}$$

where OA is accumulated okadaic acid; N is *D. acuminata* concentration (cells l⁻¹); T_{OA} is OA toxin content per *D. acuminata* cell; F filtration

rate (l day^{-1}); AE is assimilation efficiency; D_{OA} is OA detoxification rate; A is OA acylation rate; CF is accumulated conjugated forms; H is hydrolysis rate; T_{CF} is contents of conjugated forms per *D. acuminata* cell; D_{CF} is detoxification rate of conjugated forms; OAA is OA acyl-derivatives; D_{OAA} is detoxification rate of OA acyl-derivatives; and LPCF is accumulated low polarity conjugated forms.

In the two-compartment model it is assumed that, for each toxin, there are two different pools that detoxify at different rates, one fast (the first compartment) and another slow (second compartment). There is also a transfer of toxins from the first to the second compartment (Fig. 5).

$$\frac{d\text{OA}_1}{dt} = (NT_{\text{OA}}FAE) - \text{OA}_1D_{\text{1OA}} - \text{OA}_1A_1 - \text{OA}_1T_{\text{12OA}} + \text{CF}_1H$$

$$\frac{d\text{CF}_1}{dt} = (NT_{\text{CF}}FAE) - \text{CF}_1D_{\text{1CF}} - \text{CF}_1H - \text{CF}_1T_{\text{12CF}_1}$$

$$\frac{d\text{OAA}_1}{dt} = \text{OA}_1A - \text{OAA}_1D_{\text{1OAA}} - \text{OAA}_1T_{\text{12OAA}_1}$$

$$\frac{d\text{LPCF}_1}{dt} = \frac{d\text{CF}_1}{dt} + \frac{d\text{OAA}_1}{dt}$$

$$\frac{d\text{OA}_2}{dt} = \text{OA}_1T_{\text{12OA}} - \text{OA}_2A_2 - \text{OA}_2D_{\text{2OA}} + \text{CF}_2H_2$$

$$\frac{d\text{CF}_2}{dt} = \text{CF}_1T_{\text{12CF}_1} - \text{CF}_2D_{\text{2CF}} - \text{CF}_2H_2$$

$$\frac{d\text{OAA}_2}{dt} = \text{OA}_2A_2 + \text{OAA}_1T_{\text{12OAA}_1} - \text{OAA}_2D_{\text{2OAA}_2}$$

$$\frac{d\text{LPCF}_2}{dt} = \frac{d\text{CF}_2}{dt} + \frac{d\text{OAA}_2}{dt}$$

T_{12} is the transfer rate of OA or its derivatives from the first to the second compartment. The remaining acronyms are the same as in the one-compartment model with a number to indicate the compartment.

The OA derivatives may be comprised of a great variety of compounds with different solubility and it is possible that not all of them were detected in the mussels (especially DTX-4 type compounds and some diol-esters). Taking this into account, the two models were run again assuming that only a variable percent of the OA derivatives had been detected.

3.4. Model fitting

The one-compartment model provided a very good fit for the OA toxin content in mussels ($r^2 = 0.92$) as well as its LPCF ($r^2 = 0.94$) (Fig. 6). Notwithstanding, the model was not able to attain the maximum concentration of the observed OA data. The estimated rates (Table 1) suggest that most of the LPCF detected in the mussels were OA conjugated forms assimilated from the phytoplankton cells, with the acylation rate of OA being very low. For the OA acyl-derivatives the estimated detoxification rate is zero indicating that there is an almost permanent accumulation of these compounds, even when this accumulation must be slow because of the also slow acylation rate. With the two-compartment model it was

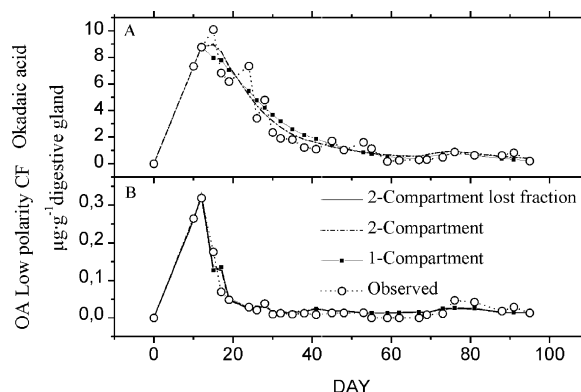


Fig. 6. Fit of the one- and two-compartment models to the OA (A) and LPCFs (B) in mussels of a raft located in the Ria de Vigo (NW, Spain).

Table 1

Estimated values of the parameters by fitting the one-compartment model to the actual data of DSP toxins accumulated by mussels

One-compartment	OA	OA conjugated forms	OA acyl-derivatives
Detox. rate (day^{-1})	0.0705	0.2274	0
Acylation rate (day^{-1})	0.0001		
Hydrolysis rate (day^{-1})		0.5817	

possible to obtain a good concordance with both the actual OA ($r^2 = 0.93$) and its LPCF data ($r^2 = 0.95$) (Fig. 6). Notwithstanding, the fitting was not found to be markedly better than that of the one-compartment, and showed the same lack of fit for the maximum concentration of OA accumulated by the mussels. In this model, as in the previous one, it seems that almost all the LPCF accumulated by the mussels were in fact the conjugated forms assimilated from the *Dinophysis* cells, because an acylation rate of zero was estimated for both compartments (Table 2). Both the hydrolysis and detoxification rates of OA conjugated forms estimated by the two models were very high.

The one-compartment model always set the percentage of detected LPCF to 100%. However, with the two-compartment model a good fit was obtained with 63% of the LPCF detected ($r^2 = 0.93$ and $r^2 = 0.96$ for OA and LPCF, respectively) and, in this case, the most important changes were the decrease in both the detoxification and hydrolysis rates of the conjugated forms (Table 2).

The toxin contents of the cells for the 1st day of *D. acuminata* detection and for the subsequent 3 sampling days, estimated by the models were within the range of values observed during the rest of the toxic episode (Table 3).

4. Discussion

Throughout the period of study only OA and its conjugated forms were detected in plankton. DTX1 or DTX2, which had been related to *D. acuminata* (Lee et al., 1989; Masselin et al., 1992; Blanco et al., 1995; Carmody et al., 1995; Dahl et al., 1995; Johansson et al., 1996; Sato et al., 1996; Fernández et al., 1998), were not found in this study. The presence of conjugated forms in plankton, suggested in our previous studies (Fernández et al., 1998), has been demonstrated here, this being the first case in which such forms have been reported. Notwithstanding, since all the research was carried out using natural plankton made up of several species, the true origin of these conjugated forms cannot be unequivocally determined. Some compounds of this type have been previously reported in cultures of *P. lima* and *P. maculosum* (Yasumoto et al., 1989; Hu et al., 1993, 1995; Quilliam et al., 1996). It seems, therefore, reasonable to assume that, in this case, they are produced by *D. acuminata*. All attempts of detecting any kind of conjugated forms in isolated *Dinophysis* cells have been, to date, unsuccessful (Fernández et al., 2001). However, the low amount of toxin that can be obtained with the used

Table 2

Estimated values of the parameters by fitting the two-compartment model to the actual data of DSP toxins accumulated by mussels

Two-compartment	OA	OA conjugated forms	OA acyl-derivatives
Detox. rate 1 (day^{-1})	0.095 (0.099)	0.371 (0.194)	0
Detox. rate 2 (day^{-1})	0.016 (0.017)	0 (0)	0
Transfer rate (day^{-1})	0.005 (0.005)	0.005 (0)	0 (0)
Acylation rate 1 (day^{-1})	0 (0.0001)		
Acylation rate 2 (day^{-1})	0 (0)		
Hydrolysis rate (day^{-1})	0.537 (0.438)		

The values given in brackets are those obtained with 63% of detected OA derivatives.

Table 3

Estimated content of OA and OA conjugated forms per *D. acuminata* cell, for the 4 sampling days, by fitting one- and two-compartment models to the actual data of DSP toxins accumulated by mussels

Date (1998)	OA (pg cell ⁻¹)		OA conjugated forms (pg cell ⁻¹)	
	One-compartment	Two-compartment	One-compartment	Two-compartment
August 31	6.85	13.3 (13.1)	3.68	0.15 (0.73)
September 3	4.51	4.16 (3.82)	0.27	0.65 (0.74)
5	1.94	3.75 (3.71)	0.23	2.06 (2.45)
7	0	10.7 (7.39)	0	0.26 (0.21)

The values given in brackets are those obtained with 63% of detected OA derivatives.

procedure (individual cell pipetting) may prevent a positive determination. It seems unlikely that any other planktonic group could be the source of these compounds because of several reasons. In the case of zooplankton, basically because of its scarcity (during the *D. acuminata* bloom) but also because, very likely, the contents of the grazed cells would be hydrolysed in the digestive system of the grazers (Quilliam et al., 1996; Windust et al., 1997, 2000). Diatoms have not been identified as producers of this kind of compound and it is very unlikely that they can acquire them from the producers. Additionally they are known to oxidize some compounds of this type (Windust et al., 1997, 2000).

Our initial hypothesis was derived from the results given in Fernández et al. (1998), who state that plankton contains OA, easily hydrolysable conjugated forms and none or a very small amount of acyl-derivatives of the DTX3 type. This hypothesis would seem to be at least partially correct, as the models built on its basis fit the data reasonably well. It appears that both OA and its conjugated forms present in plankton are taken up by mussels and assimilated at approximately the same rate, as there was no need to include different rates for each toxin group to achieve a good fitting. The hydrolysis rates of the conjugated forms are also similar to those suggested in Fernández et al. (1998), and therefore they are in the expected range. The same was true for the acylation rate of OA and for the depuration rate of the acylated compounds.

Notwithstanding, there is a questionable result in one of the estimated rates. The detoxification rate for the OA conjugated forms was very high. This result cannot be derived from incorrect estimations of the other parameters of the model. The most likely explanation for it is that the two different techniques used to quantify the toxins in mussels and plankton do not measure exactly the same compounds. In our opinion, one group of compounds was missed in the toxin analysis of the mussels, but not in that of the plankton. Apparently, when the enzymatic hydrolysis of the plankton samples occurred, it was not only the low polarity derivatives that were converted to OA, but also other more polar conjugated forms. On the other hand, the procedure used in this study in mussels (in which the final methanol layer is rejected) only measures the low polarity forms (hexane fraction). The more polar conjugated forms, once assimilated by mussels, would neither contribute to the low polarity fraction of the toxin extracts nor be identified in the polar fraction (because in chloroform fraction only OA, DTX1 and DTX2 can be detected). In this way, this part of the conjugated toxins, which were fed into the model, “disappear”, and this is interpreted by the model as a fast depuration. This hypothesis was checked including a variable percentage of OA derivatives detected in both models and the expected response was obtained in the two-compartment model with a decrease in the detoxification rate of the conjugated forms. The presence of DTX4-type toxins and diol-esters in the plankton

would produce the response found, because they have the two characteristics already mentioned: (a) they (or at least some of them) are polar enough to be excluded from the low polarity fraction of the toxin extracts; and (b) they are easily hydrolysable, thus contributing to the hydrolysable fraction of the plankton samples. Quilliam et al. (1996) observed that the enzymatic conversion of DTX-4 type compounds to diol-ester, when the cells of *P. lima* are disrupted, is very fast (minutes) followed by a slower (hours) enzymatic conversion of diol-esters to OA. Windust et al. (1997) also observed that the increase in OA concentration due to the hydrolysis of DTX-4 and OA diol-esters may occur in a sterile medium, without the presence of any organism. The hydrolysis rates observed by these authors were very similar to those estimated by the two models applied in this study. However, the possibility that this relatively polar and highly hydrolysable fraction is comprised of another substance cannot be overlooked.

OA is progressively acylated and therefore transformed to low polarity derivatives, probably of the DTX3 type, as demonstrated by Suzuki et al. (1999), Suzuki and Mitsuya (2001). The rate at which these acylated compounds are formed is low, but they are nearly not eliminated, supporting the findings by Fernández et al. (1998) on the same bivalve species. The combination of these two characteristics of their kinetics limits the toxic relevance of the acylated forms to the final phase of long lasting DSP episodes, in the case of *M. galloprovincialis*. In other bivalve species this may not be the case, as suggested by the data obtained by Vale and Sampayo (1999), which probably need much higher acylation rates to take place.

The toxin content per *D. acuminata* cell obtained in this study, and the values for the first 4 days estimated from the fitting of the model, are within the range of values observed in different places for this species (Cembella, 1989; Lee et al., 1989; Andersen et al., 1996; Johansson et al., 1996), and in the range of values previously observed and, at the same time, in Galician Rías (Blanco et al., 1995; Fernández et al., 2001; Maneiro et al., 2000).

No clear compartmentalization of the toxins was found given that a one-compartment model

was sufficient to explain the intoxication–detoxification processes. Bauder et al. (1996), Holmes et al. (1999) observed that the OA and its derivatives accumulated in the d.g. of *Argopecten irradians* and *Perna viridis* show seemingly biphasic detoxification kinetics. All of this indicates that probably even when it is possible that a small second compartment exist in the d.g., its importance would be, in such a case, so small that it would not justify the increment in the complexity of the model.

5. Conclusion

The hypothesis suggested by Fernández et al. (1998) seems to be correct, this being the first report of OA conjugated forms in natural plankton. Moreover, OA is acylated at a very low rate and the ingested LPCF are quickly hydrolysed. It seems also that there are some hydrolysable toxin derivatives in the plankton that are not low polarity compounds, but no production of substances of this kind has been described for *Dinophysis* species. Further studies applying LC-MS/MS techniques will be done to identify the nature of the different conjugated forms and accurately determine its contribution to the DSP toxin content in both *Dinophysis* cells and mussels.

Acknowledgements

We wish to express our gratitude to J. Correa and S. Muñiz for their technical assistance in the HPLC-FD analysis of the samples. The authors would also like to thank to the staff of the Department of Oceanographic Conditions and Phytoplankton (F. Amoedo, C. Díaz, P. García, I. Lemos, A. López, J. Mouriño and S. Roura) and to the Sampling Department (S. Bastos, M.J. Crespo, P. Ferreiro, M.T. García, M. Isorna, M. Madriñán) for their technical assistance. This experiment was partially supported by the projects CITMAR 98-0978 and PGIDT-CIMA-99/03 (Plan Galego de Investigación e Desenvolvemento Tecnolóxico).

References

- Andersen, P., Hald, B., Emsholm, H., 1996. Toxicity of *Dinophysis acuminata* in Danish coastal waters. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, New York, pp. 281–284.
- Bauder, A.G., Cembella, A.D., Quilliam, M.A., 1996. Dynamics of diarrhetic shellfish toxins from the dinoflagellate, *Prorocentrum lima*, in the bay scallop, *Argopecten irradians*. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, New York, pp. 433–436.
- Blanco, J., Fernández, M., Mariño, J., Reguera, B., Míguez, A., Maneiro, J., Cacho, E., Martínez, A., 1995. From *Dinophysis* spp. toxicity to DSP outbreaks: a preliminary model of toxin accumulation in mussels. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P., Marcaillou, C. (Eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, Paris, pp. 777–782.
- Blanco, J., Moróño, A., Franco, J., Reyero, M.L., 1997. PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One- and two-compartment models and the effect of some environmental variables. Mar. Ecol. Prog. Ser. 158, 165–175.
- Blanco, J., Fernández, M., Míguez, A., Moróño, A., 1999. Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions. Mar. Ecol. Prog. Ser. 176, 153–163.
- Carmody, E.P., James, K.J., Kelly, S.S., Thomas, K., 1995. Complex diarrhetic shellfish toxin profiles in Irish mussels. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P., Marcaillou, C. (Eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, Paris, pp. 273–278.
- Cembella, A.D., 1989. Occurrence of okadaic acid, a major diarrhetic shellfish toxin, in natural populations of *Dinophysis* spp. from the eastern coast of North America. J. Appl. Phycol. 1, 307–310.
- Dahl, E., Rogstad, A., Aune, T., Hormazabal, V., Underdal, B., 1995. Toxicity of mussels related to occurrence of *Dinophysis* species. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P., Marcaillou, C. (Eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, Paris, pp. 783–788.
- Fernández, M.L., Míguez, A., Cacho, E., Martínez, A., 1996. Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. Toxicon 34, 381–387.
- Fernández, M.L., Míguez, A., Moróño, A., Cacho, E., Martínez, A., Blanco, J., 1998. Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 449–452.
- Fernández, M.L., Reguera, B., Ramilo, I., Martínez, A., 2001. Toxin of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from the Galician Rías Bajas. In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (Eds.) Harmful Algal Blooms 2000. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 360–363.
- Holmes, M.J., Ming Teo, S.L., Woo Khoo, H., 1999. Persistent low concentrations of diarrhetic shellfish toxins in green mussels *Perna viridis* from the Johor Strait, Singapore: first record of diarrhetic shellfish toxins from South-East Asia. Mar. Ecol. Prog. Ser. 181, 257–268.
- Hu, T., Marr, J., de Freitas, A.S.W., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 1992. New diol esters isolated from cultures of the dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*. J. Nat. Prod. 55, 1631–1637.
- Hu, T., de Freitas, A.S.W., Doyle, J., Jackson, D., Marr, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 1993. New DSP toxin derivatives isolated from toxic mussels and the dinoflagellates, *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier Science Publishers BV, pp. 507–512.
- Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., McLachlan, J.L., Wright, J.L.C., 1995. Identification of DTX4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 597–599.
- James, K.J., Bishop, A.G., Gillman, M., Kelly, S.S., Roden, C., Draisci, R., Lucentini, L., Gianetti, L., 1998. The diarrhetic shellfish poisoning toxins of *Dinophysis acuta*: identification and isolation of dinophysistoxin-2 (DTX-2). In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 489–492.
- Johansson, N., Granéli, E., Yasumoto, T., Carlsson, P., Legrand, C., 1996. Toxin production by *Dinophysis acuminata* and *D. acuta* cells grown under nutrient sufficient and deficient conditions. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, New York, pp. 277–280.
- Lee, J.S., Yanagi, T., Kenma, R., Yasumoto, T., 1987. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography. Agric. Biol. Chem. 51, 877–881.
- Lee, J.S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., Yasumoto, T., 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. J. Appl. Phycol. 1, 147–152.
- Lindhal, O., 1986. A dividable hose for phytoplankton sampling. ICES, CM, L, 26, annex 3.
- Mariño, J., Maneiro, J., Blanco, J., 1998. The harmful algae monitoring programme of Galicia: good value for money. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 437–440.
- McMahon, T., Raine, R., Silke, J., 1998. Oceanographic control of harmful phytoplankton blooms around south-western Ireland. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia

- and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 128–130.
- Maneiro, I., Frangopoulos, M., Guisande, C., Fernández, M., Reguera, B., Riveiro, I., 2000. Zooplankton as a potential vector of diarrhetic shellfish poisoning toxins through the food web. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 201, 155–163.
- Marr, J.C., Hu, T., Pleasance, S., Quilliam, M., Wright, J., 1992. Detection of new 7-O-acyl derivatives of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 30, 1621–1630.
- Masselin, P., Lassus, P., Bardouil, M., 1992. High performance liquid chromatography analysis of diarrhetic toxins in *Dinophysis* spp. from the French coast. *J. Appl. Phycol.* 4, 385–389.
- Moróño, A., Maneiro, J., Pazos, Y., Blanco, J., 1998. Modeling the accumulation of PSP toxins in Galician mussels: results and perspectives. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 441–444.
- Navarro, E., Iglesias, J.I.P., Perez-Camacho, A., Labarta, U., Beiras, R., 1991. The physiological energetics of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) from different cultivation rafts in the Ría de Arosa (Galicia, NW Spain). *Aquaculture* 94, 197–212.
- Quilliam, M.A., Hardstaff, W.R., Ishida, N., McLachlan, J.L., Reeves, A.R., Ross, N.W., Windust, A.J., 1996. Production of Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, New York, pp. 289–292.
- Reguera, B., Bravo, I., Marcaillou-Le Baut, C., Masselin, P., Fernández, M.L., Míguez, A., Martínez, A., 1993. Monitoring of *Dinophysis* spp. and vertical distribution of okadaic acid on mussel rafts in Ría de Pontevedra (NW, Spain). In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier Science Publishers BV, pp. 553–558.
- Sato, S., Koike, K., Kodama, M., 1996. Seasonal variation of okadaic acid and dinophysistoxin-1 in *Dinophysis* spp. in association with the toxicity of scallop. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, New York, pp. 285–288.
- Silvert, W.L., Cembella, A.D., 1995. Dynamics modeling of phycotoxin kinetics in the blue mussel, *Mytilus edulis*, with implications for other marine invertebrates. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 521–531.
- Silvert, W.L., Bricelj, M., Cembella, A.D., 1998. Dynamic modelling of PSP toxicity in the surfclam (*Spisula solidissima*): multicompartmental kinetics and biotransformation. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 437–440.
- Subba Rao, D.V., Pan, Y., Zitko, V., Budgen, G., Mackeigan, K., 1993. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) associated with a subsurface bloom of *Dinophysis norvegica* in Bedford Basin, eastern Canada. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 97, 117–126.
- Suzuki, T., Mitsuya, T., 2001. Comparison of dinophysistoxin-1 and esterified dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) contents in the scallop *Patinopecten yessoensis* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 39, 905–908.
- Suzuki, T., Mitsuya, T., Imai, M., Yamasaki, M., 1997. DSP toxin contents in *Dinophysis fortii* and scallops collected at Mutsu Bay, Japan. *J. Appl. Phycol.* 8, 509–515.
- Suzuki, T., Ota, H., Yamasaki, M., 1999. Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon* 37, 187–198.
- Vale, P., 1999. Caracterização de toxinas DSP na costa portuguesa. Doctoral thesis, University of Lisboa, Portugal.
- Vale, P., Sampayo, M.A., 1999. Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon* 37, 1109–1121.
- Widdows, J., Fieth, P., Worrall, C.M., 1979. Relationships between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 50, 195–207.
- Windust, A.J., Quilliam, M.A., Wright, J.L.C., McLachlan, J.L., 1997. Comparative toxicity of the diarrhetic shellfish poisons, okadaic acid, okadaic acid diol-ester and dinophysistoxin-4, to the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Toxicon* 35, 1591–1603.
- Windust, A.J., Hu, T., Wright, J.L.C., Quilliam, M.A., McLachlan, J.L., 2000. Oxidative metabolism by *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) of a diol-ester of okadaic acid, the diarrhetic shellfish poisoning. *J. Phycol.* 36, 342–350.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G., Clardy, J., 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* 41, 1019–1025.
- Yasumoto, T., Murata, M., Lee, J., Korigoe, K., 1989. Polyether toxins produced by dinoflagellates. In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, T. (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins '88*. Elsevier, Amsterdam, pp. 375–382.

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Artículo 6

“Okadaic acid depuration in the mussels *Mytilus galloprovincialis*: one and two compartment models and the effect of environmental conditions”.

En los trabajos que constituyen el artículo 6 se estudió la cinética de detoxificación del AO y el efecto sobre la misma de diferentes parámetros ambientales, mediante la transferencia de mejillones contaminados a distintas zonas libres de toxinas y con distintas condiciones ambientales. El efecto de las condiciones ambientales y del peso del cuerpo del mejillón en las tasas de depuración fue estudiado mediante un análisis de componentes principales, mediante un análisis de regresión múltiple y mediante el ajuste de cuatro modelos de la cinética de depuración: de 1 y 2 compartimentos, cada uno de ellos en dos versiones, esto es, incluyendo y sin incluir los efectos de las variables ambientales y el peso del cuerpo.

Resultados y discusión

El AO fue la única toxina detectada en concentraciones relevantes. Su tasa de depuración varió entre 0.22 y 0.02 días⁻¹, siendo estos resultados similares a los encontrados en nuestros trabajos previos (Blanco *et al.*, 1995).

Las variables ambientales estudiadas presentaron una covariación muy alta durante el estudio, lo cual condujo a que en el análisis de componentes principal quedaran, en general, asociadas en un solo componente. Esa misma covariación hizo muy difícil el establecimiento de una relación entre la tasa de depuración y cada uno de los factores ambientales determinados, ya que aunque podía detectarse un ligero efecto no pudo atribuirse de forma inequívoca y concluyente a una variable determinada. De todas formas, y a la vista de los datos obtenidos, no parece probable que la temperatura y la salinidad sean los factores ambientales que afecten la tasa de depuración. En el caso de la temperatura, porque aparece una relación negativa y por tanto opuesta a lo esperable tanto para procesos fisiológicos como físico-químicos. En el segundo caso porque no es previsible un efecto positivo de la salinidad sobre la tasa de depuración de compuestos que nos son hidrosolubles. Las variables que pueden tener influencia quedan, por tanto, restringidas a la fluorescencia y la transmisión de luz, las cuales son índices de la cantidad de alimento de que disponen los mejillones. La transmisión está relacionada (inversamente) con la concentración de seston total y la fluorescencia con la cantidad de fitoplancton. Por consiguiente, lo más probable es que pueda

existir un pequeño efecto de la cantidad de alimento del que disponen los mejillones sobre la velocidad de depuración, si bien los datos no son concluyentes.

El peso corporal no mostró un efecto constante sobre la tasa de depuración a lo largo del período estudiado, pero la mayor parte de las observaciones son coherentes con los procesos de dilución de la concentración de toxinas derivados del aumento de la biomasa.

Todos los modelos describieron bien la depuración observada, explicando el 97, 96 y 99 % de la varianza (1 compartimento, 1 compartimento con variables ambientales y 2 compartimentos respectivamente). Sin embargo, se observaron diferencias en los aspectos cualitativos del ajuste, lo que se muestra en la manera en que se distribuyen los residuales. El modelo de 1 compartimento sin condiciones ambientales no describió correctamente la parte final de la depuración ni en el contenido de toxinas, que fue infraestimado (residuales positivos), ni en lo que se refiere a las tendencias, mostrando los datos reales una tendencia a decrecer que no fue observada en la respuesta esperada del modelo. Cuando los resultados de la regresión global entre la tasa de depuración y las variables ambientales fueron incluidos, el modelo se ajustó cualitativamente mejor a los datos observados. El modelo de 2 compartimentos (sin incluir las variables ambientales y el peso del cuerpo) se ajustó bien a los datos reales. Los valores obtenidos para el primer periodo de muestreo fueron mucho más próximos a los valores observados que en los dos modelos anteriores y los residuales se agruparon hacia el centro. Los parámetros estimados para este modelo fueron una tasa de depuración para el primer y segundo compartimento de 0.17 y 0.10 día⁻¹ respectivamente, una tasa de transferencia entre el primero y el segundo compartimento de 0.31 día⁻¹ y una contribución inicial de las toxinas en el primer compartimento de 99.9 %.

Al incluir las variables ambientales en el modelo de dos compartimentos la tasa de transferencia entre compartimentos se estima que es 0 y el porcentaje inicial en el primer compartimento es el 100%, lo cual quiere decir que se comporta como un solo compartimento. Por tanto la variación no explicada por el modelo simple de un compartimento, que es el que se usa habitualmente para calcular las tasas de depuración, puede ser explicada de dos formas excluyentes: 1) por medio de la incorporación de las variables ambientales (lo que supondría que realmente el ambiente afecta a la depuración), ó 2) por medio de la incorporación de un segundo compartimento. Si se incluye el efecto del ambiente no hay lugar para el segundo compartimento y viceversa. Todo esto implica que, si se pretende estimar adecuadamente el efecto de las variables externas del sistema, sea

necesario previamente tener muy claro cuales son los modelos adecuados para describir la cinética.

Las tasas de depuración encontradas fueron similares a las estimaciones previas en la misma área, si bien las primeras fueron obtenidas optimizando el ajuste a un modelo de acumulación-depuración (Blanco *et al.*, 1995).

Como se muestra en varias contribuciones a esta tesis doctoral, parte de esta incertidumbre en relación a los verdaderos efectos de factores ambientales en la tasa de depuración radica en el hecho de que una correcta estimación requiere un sólido conocimiento conceptual y matemático de la cinética de las toxinas implicadas (Morono *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 1999) y este conocimiento ha empezado a emerger en años recientes con el descubrimiento y la demostración de la contribución real de muy diversos compuestos al contenido total de toxinas en los bivalvos (Vale and Sampayo, 2002 a; MacKenzie *et al.*, 2002; Morono *et al.* 2003) y con el desarrollo de modelos matemáticos de acumulación.

Artículo 7.

“Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels”.

En los trabajos que dieron lugar al artículo 7 se estudió el contenido en toxinas del grupo del AO en mejillones mediante HPLC-FD y se investigó la presencia de derivados acilados de baja polaridad “DTX3” en la fracción de hexano proveniente del proceso de purificación del extracto de mejillón y mediante la realización de una hidrólisis alcalina del mismo.

Resultados y discusión

El AO fue la toxina mayoritaria en los mejillones. Todos los mejillones contaminados con AO, contenían derivados del AO de menor polaridad, muy probablemente del tipo “DTX3”, que se hicieron evidentes tras la hidrólisis alcalina de los extractos de hexano, que transforma estos compuestos en AO. En todos los mejillones analizados, la cantidad de dichos derivados, expresada en equivalentes de AO fue considerablemente menor que la de AO.

El presente trabajo demostró por primera vez la presencia de derivados del AO de baja polaridad en mejillones españoles. Se han descrito dos tipos diferentes de este tipo de derivados que tras ser sometidos a una hidrólisis alcalina dan lugar al AO: los diol ésteres, en los que la esterificación tiene lugar en el grupo carboxilo (Yasumoto *et al.*, 1987; Hu *et al.*,

1993) y los derivados acilados (DTX3), en los que el grupo hidroxilo de la posición C7 está esterificado con un ácido graso (Yasumoto *et al.*, 1987; Marr *et al.*, 1992). Si bien los derivados del primer tipo habían sido descritos en los dinoflagelados bentónicos *Prorocentrum concavum* y *P. lima*, y esta última especie está presente en las Rías Bajas, en áreas próximas a las zonas de producción, su implicación en la intoxicación de mejillones no ha sido demostrada hasta la fecha. Por esta razón, y teniendo en cuenta los hallazgos previos de acil derivados en mejillones irlandeses (Marr *et al.*, 1992), planteamos como hipótesis que los derivados de baja polaridad solubilizados en la capa de hexano pertenecen a este grupo.

A la vista de los resultados obtenidos, parece razonable que cualquier procedimiento de ensayo o análisis utilizado para determinar las toxinas DSP presentes en las muestras de moluscos debe tener en cuenta que la fase de hexano, usualmente utilizada para la purificación de las muestras y que es posteriormente descartada, puede ser muy rica en derivados del AO de menor polaridad. Es importante mencionar que algunos protocolos de bioensayo en ratón utilizados para la monitorización de toxinas en los moluscos incluyen lavados con hexano para evitar los falsos positivos que pudieran derivarse de la presencia de ácidos grasos en las muestras. Aunque en el caso de las muestras de mejillón analizadas en este trabajo, estos compuestos sólo alcanzaron valores elevados en el caso de que ya estuvieran contaminados con elevadas concentraciones de AO, las ventajas de utilizar los lavados con hexano deben ser reconsideradas a la vista de la posibles pérdidas de toxinas que se producen durante este proceso, que sin duda debe ser evitado en el análisis de muestras de origen o perfil de toxinas desconocido. Es importante mencionar que los acil derivados de la DTX1 han sido documentados como las toxinas mayoritarias en vieiras japonesas y que la presencia de DTX3 en almejas (*Scrobicularia plana*) y navajas (*Solen marginatus*) de aguas portuguesas fue relacionada con una reciente intoxicación diarreica en Portugal (Vale and Sampayo, 2002c). Así, dependiendo de la especie de molusco, de su origen y de diferentes factores que puedan afectar la actividad metabólica, la contribución de los acil derivados puede ser más o menos importante, y debe ser tomada en cuenta en los programas de monitorización de las toxinas. Se sugiere por tanto que el paso de hidrólisis alcalina de la fase de hexano obtenida tras la partición líquido-líquido sea incluida en los procedimientos de HPLC-FD.

Artículo 8.

“Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain”.

En los trabajos correspondientes al artículo 8 se estudió la cinética de detoxificación del AO, DTX2 y DTX3 mediante la transferencia de mejillones contaminados a una zona libre de toxinas y el análisis por HPLC-FD de los niveles de toxinas durante el periodo de depuración. La variación temporal de DTX3 fue monitorizada mediante la hidrólisis alcalina de los extractos de hexano de los mejillones y posterior determinación por HPLC-FD de las correspondientes toxinas precursoras obtenidas tras la hidrólisis. Para la estimación de las tasas de acilación y detoxificación se utilizaron dos modelos de dos compartimentos, el primero incluyó la acilación de AO y DTX2 mientras que el segundo se estableció sin incluir este proceso, y considerando que las dos toxinas principales y sus correspondientes derivados tienen sus propias dinámicas y son independientes entre sí.

Resultados y discusión

El AO y la DTX2 fueron las toxinas mayoritarias en los mejillones, siendo la cantidad de AO siempre superior a la de DTX2.

Se detectó la presencia de derivados de AO y DTX2 de baja polaridad en todos los mejillones analizados, si bien siempre en menor proporción que las correspondientes toxinas con el grupo carboxílico libre.

En lo que respecta al proceso de eliminación de las toxinas, la concentración de AO y DTX2 disminuyó en un 85% y en un 70% respectivamente, en un periodo de 38 días.

El proceso de eliminación de las toxinas se puede describir como bifásico (rápido-lento), con una primera fase en la que se elimina la mayor parte de las toxinas (85% del AO y 70% de DTX2) y que tiene una duración aproximada de 38 días, y una segunda fase en que la eliminación es mucho más lenta y los niveles remanentes de toxinas permanecen detectables durante mucho tiempo.

La tasa de depuración depende de las toxinas. El AO se elimina más rápidamente que la DTX2 y a su vez las toxinas carboxílicas se eliminan más rápidamente que los derivados acilados correspondientes.

La cinética de depuración del AO y la DTX2 puede describirse razonablemente bien mediante modelos de uno o de dos compartimentos, si bien este último describe mejor la rápida detoxificación del primer periodo y la progresiva ralentización observada en el segundo periodo. Ambos modelos estiman una velocidad de depuración de la DTX2 más baja que la correspondiente al AO. El mismo comportamiento se observa en el caso de los correspondientes derivados acilados.

Los derivados acilados presentan una cinética de depuración muy diferente a la de las correspondientes toxinas polares, sugiriendo importantes diferencias en el mecanismo implicado. Ni siquiera el modelo de dos compartimentos describe razonablemente bien la eliminación de los derivados de baja polaridad para los que se observa una rápida eliminación al principio que decrece considerablemente con el tiempo, alcanzando un nivel que permanece prácticamente constante e incluso aumenta ligeramente en el periodo central del experimento.

La inclusión de la tasa de acilación en el modelo mejora considerablemente el ajuste, del modelo a los datos reales, pero produce estimaciones anormalmente altas de las velocidades de depuración, que podrían ser producidas por una inexactitud de dichas estimaciones o bien por una estructura inadecuada del modelo. Esto último parecería razonable en el caso de que otros mecanismos intervinieran en la cinética de detoxificación de dichos derivados. Un posible mecanismo para el que no es necesario asumir tasas iniciales de depuración muy altas podría ser el siguiente: los mejillones asimilan del fitoplancton toxinas DSP tales como diol ésteres o compuestos del tipo DTX4/DTX5. Estos compuestos son rápidamente hidrolizados a AO y DTX2 por acción de las esterasas presentes en las glándulas digestivas o por aquellas liberadas por las células planctónicas y simultáneamente se produce una lenta acilación del AO y la DTX2. En este caso el modelo interpretaría como depuración lo que en realidad sería una hidrólisis rápida de derivados de baja polaridad que estarían presentes en el plancton.

Teniendo en cuenta las cinéticas de depuración observadas, aquellos episodios tóxicos en los que esté implicada la DTX2 serán de duración más prolongada que aquellos en los que únicamente esté presente el AO. Asimismo, en el caso de que se produzcan derivados acilados en gran cantidad, se prolongará notablemente el periodo necesario para la eliminación de las toxinas.

La toxicidad remanente al final del experimento es considerable y puede permanecer por largos periodos de tiempo, en muchos casos por debajo del límite de detección de los métodos

oficiales de control. El riesgo de una exposición crónica a pequeñas cantidades de estas toxinas debe ser tenido en cuenta a la hora de valorar la trascendencia para la salud humana de la actividad de promoción de crecimiento tumoral exhibida por este grupo de toxinas.

Artículo 9

“Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*”.

En los trabajos correspondientes al artículo 9 se determinó la concentración de toxinas DSP en plancton y en mejillones durante varios episodios de DSP causados por *D. acuminata* y se implementaron una serie de modelos que fueron ensayados con los datos obtenidos, con el propósito de estimar la importancia de los diferentes procesos implicados en la asimilación, transformación y eliminación de toxinas.

Resultados

El AO fue la toxina principal detectada en los mejillones (entre 0.18 y 10.1 $\mu\text{g g}^{-1}$). Además del AO, se detectaron derivados conjugados de baja polaridad (muy probablemente DTX3) que contribuyeron hasta un máximo de un 6.2 % del contenido total de toxinas (expresado en equivalentes de AO). La razón entre los derivados del AO y el AO varió con el tiempo, mostrando un descenso inicial, seguido de un incremento hasta niveles superiores a los detectados al comienzo del episodio tóxico.

Parte del AO estaba presente en el plancton en forma de derivados conjugados (muy probablemente diol ésteres ó compuestos del tipo DTX4, como se deduce del incremento en las cantidades de AO observado tras la hidrólisis enzimática de las muestras de plancton.

El contenido de AO por célula de *D. acuminata* varió entre “no detectado” y 11.3 pg cel⁻¹ y el contenido en formas conjugadas entre “no detectado” y 5.2 pg cel⁻¹. Las formas conjugadas representaron entre un 12 y el 100 % del contenido total de toxinas. El contenido total máximo encontrado fue de 15.6 pg cel⁻¹.

Se verifica la hipótesis formulada en nuestros trabajos previos (Fernández *et al.*, 1998), en la que se proponía que existen en *Dinophysis* derivados de baja polaridad del ácido okadaico y de la DTX2 que se hidrolizan rápidamente en el mejillón para dar las toxinas libres, ya que los modelos desarrollados en base a esta hipótesis explicaron razonablemente bien los datos observados.

Se implementaron diversos modelos, de complejidad creciente, en los que se incluyó la hidrólisis de los derivados de baja polaridad existentes en el plancton, para tratar de describir correctamente la cinética de acumulación de toxinas observada. El modelo de un

compartimento explicó bien el contenido de AO en mejillones. También explicó bien el contenido de los derivados conjugados de baja polaridad. Las tasas estimadas sugieren que la mayor parte de los derivados del AO detectados en los mejillones fueron formas conjugadas asimiladas de las células de fitoplancton, siendo la tasa de acilación muy baja.

En lo que respecta a los derivados acilados, la tasa de eliminación necesaria para obtener el mejor ajuste es cero, indicando que existe una casi permanente acumulación de estos compuestos, aunque esta acumulación sea lenta debido a la baja tasa de acilación.

Con el modelo de 2 compartimentos se obtuvo una buena concordancia con los datos reales tanto para el AO como para sus derivados de baja polaridad. Sin embargo el ajuste no fue considerablemente mejor que el del modelo de un compartimento. Al igual que en el modelo de 1 compartimento, parece que casi todos los derivados de baja polaridad acumulados por los mejillones fueron formas conjugadas asimiladas de las células de *Dinophysis*, ya que se estimó una tasa de acilación cero en los dos compartimentos. Las tasas de hidrólisis y de eliminación de las formas conjugadas del AO estimadas por ambos modelos fueron muy elevadas.

Parecería por tanto que tanto el AO como sus formas conjugadas presentes en el plancton son ingeridas y asimiladas por los mejillones a una velocidad similar, ya que no hubo necesidad de introducir diferentes tasas de asimilación para cada grupo de toxinas. Las tasas de hidrólisis de las formas conjugadas fueron similares a las encontradas en Fernández *et al.*, (1998), así como las tasas de acilación del AO y las tasas de depuración de los compuestos acilados.

La tasa de detoxificación de las formas conjugadas del AO fue muy alta. Este resultado no puede estar derivado de estimaciones incorrectas de los otros parámetros del modelo. La explicación más probable es que las dos diferentes técnicas utilizadas para cuantificar las toxinas en plancton y en los mejillones no miden exactamente el mismo rango de compuestos. En nuestra opinión, existe un grupo de compuestos que no es detectado en el análisis realizado sobre los mejillones (hidrólisis alcalina de los extractos de hexano) pero que sí es detectado en la hidrólisis enzimática que se desarrolla en los extractos de plancton.

Aparentemente, mediante la hidrólisis enzimática no sólo los derivados de baja polaridad presentes en el plancton se convierten a AO sino también las formas conjugadas de mayor polaridad. El procedimiento utilizado en el análisis de los mejillones solo mide las formas conjugadas de baja polaridad. Las formas conjugadas de mayor polaridad que pudieran ser asimiladas por los mejillones a partir del plancton no serían solubilizadas en la fracción de hexano. De esta manera, una parte de las toxinas conjugadas que fueron incluidas

dentro del modelo desaparecerían aparentemente, y esto es interpretado por el modelo como una depuración rápida. Esta hipótesis se comprobó mediante la introducción de un porcentaje variable de los derivados de AO en ambos modelos y la respuesta esperada apareció, en el modelo de dos compartimentos, como un descenso en la tasa de detoxificación de las formas conjugadas.

La presencia de toxinas del tipo DTX4 y diol ésteres en el plancton encajaría bien con la respuesta encontrada, ya que este tipo de compuestos exhibe las dos características previamente mencionadas: 1) son compuestos suficientemente polares como para ser excluidos de la fracción de hexano de los extractos y 2) son fácilmente hidrolizables, contribuyendo de esta manera a la fracción obtenida a partir de la hidrólisis enzimática de los extractos de plancton.

El AO es progresivamente acilado y por tanto transformado en derivados de baja polaridad, probablemente del tipo DTX3. La velocidad a la cual se producen estos compuestos acilados es baja, pero su tasa de eliminación es prácticamente nula, confirmando de esta manera los resultados que encontramos en los trabajos previos. La combinación de estas dos características de su cinética limita la relevancia de las formas aciladas desde el punto de vista de su toxicidad en *Mytilus galloprovincialis* a la fase final de periodos de episodios de DSP que sean muy prolongados.

No se encuentra una clara compartimentalización de las toxinas, dado que el modelo de un compartimento fue suficiente para explicar los procesos de intoxicación-detoxificación. Es probable que en el caso de que exista un segundo compartimento en la glándula digestiva, su importancia sea tan pequeña que no justifique el incremento de complejidad que supone el uso del modelo de dos compartimentos.

Se confirman las hipótesis del trabajo realizado anteriormente (Fernández *et al.*, 1998), siendo estos trabajos la primera documentación de la existencia en plancton de formas conjugadas derivadas del AO.

CONCLUSIONES

Sobre los perfiles de toxinas en el fitoplancton y el mejillón y sobre el origen de las intoxicaciones

La notable diferencia entre los perfiles de toxinas de *P. lima* y los perfiles correspondientes a los moluscos contaminados durante episodios de DSP corroboran que la inmensa mayoría de los episodios tóxicos de tipo DSP que se registran en el mejillón de Galicia no son debidos a *Prorocentrum lima* y, por tanto, *D. acuminata*, *D. acuta* y *D. caudata* deben ser los organismos principales que contribuyen a la toxicidad DSP de los moluscos de las Rías Gallegas. La monitorización de las poblaciones de estas últimas especies debe ser, por tanto, considerada en los programas de control de las aguas de producción.

El perfil de toxinas de los mejillones depende de las especies fitoplanctónicas presentes. Los episodios de *D. acuminata* dan lugar a perfiles tóxicos en mejillón en los que el AO es la toxina predominante, mientras que la presencia de *D. acuta* da lugar a perfiles más complejos, en los que además de AO y DTX2 se observan cantidades importantes de PTX2SA. Es presumible que la presencia de *D. caudata*, organismo productor de PTX2, en el plancton contribuya también a la aparición de PTX2-sa en mejillones.

Los derivados de baja polaridad forman parte del perfil de toxinas DSP de los mejillones si bien siempre en menor proporción que las correspondientes toxinas principales (AO y DTX2).

La fracción de hexano que se obtiene en la partición líquido-líquido realizada para eliminar los lípidos no polares de los extractos y que es usualmente descartada, puede ser muy rica en derivados de baja polaridad. Es recomendable la inclusión de una hidrólisis alcalina de dichos extractos para la investigación de la presencia de estos compuestos.

Sobre la acumulación, transformación y eliminación de las toxinas en el mejillón

En lo que respecta a la ingestión, acumulación y transformación de las toxinas por parte de los moluscos, los resultados obtenidos sugieren que el AO y la DTX2 se encuentran, al menos en parte, en forma de derivados sulfatados o diol ésteres en las células de los dinoflagelados. Los mejillones ingieren y asimilan estas toxinas del fitoplancton que son rápidamente hidrolizadas a AO y DTX2 por acción de las esterasas presentes en las glándulas digestivas o por aquéllas liberadas por las células planctónicas. Simultáneamente se produce una lenta acilación del AO y la DTX2. En relación a las pectenotoxinas, los resultados

sugieren que la PTX2, que es la pectenotoxina predominante en fitoplancton es convertida en el correspondientes secoácido una vez que es ingerida y asimilada por el mejillón.

La tasa de depuración depende de las toxinas. El AO se elimina más rápidamente que la DTX2 y a su vez las toxinas principales (AO y DTX2) se eliminan más rápidamente que los derivados de baja polaridad correspondientes. Teniendo en cuenta las cinéticas de depuración observadas, aquellos episodios tóxicos en los que esté implicada la DTX2 serán de duración más prolongada que aquellos en los que únicamente esté presente el AO. Asimismo, en el caso de que se produzcan derivados de baja polaridad en gran cantidad, se prolongará notablemente el periodo necesario para la eliminación de las toxinas.

Los derivados de baja polaridad presentan una cinética de depuración muy diferente a la de las correspondientes toxinas de origen, sugiriendo la implicación de varios tipos de compuestos. Se observa una rápida eliminación al principio que decrece considerablemente con el tiempo, alcanzando un nivel que permanece prácticamente constante e incluso aumenta ligeramente en el periodo central del experimento. La explicación más plausible es que los derivados poco polares procedentes de las células, probablemente diol ésteres, se hidrolizan sufriendo una aparente eliminación rápida que en realidad es una transformación a las toxinas correspondientes con el carboxilo libre, que a su vez se esterifican lentamente con ácidos grasos para dar acil-derivados de tipo DTX3 que se eliminan muy lentamente.

La velocidad a la cual se producen los compuestos acilados es baja, pero su tasa de eliminación es prácticamente nula. La combinación de estas dos características de su cinética limita la relevancia de las formas aciladas, desde el punto de vista de su contribución a la toxicidad en *M. galloprovincialis*, a la fase final de periodos de episodios de DSP que sean muy prolongados.

No se encuentra una clara compartimentalización de las toxinas dentro de la glándula digestiva, dado que el modelo de un compartimento fue suficiente para explicar los procesos de intoxicación-detoxificación. En el caso de que exista un segundo compartimento en la glándula digestiva, su importancia es pequeña, dando lugar a una ligera toxicidad remanente.

En algunos casos, la toxicidad remanente no es despreciable y puede permanecer por largos periodos de tiempo, en muchos casos por debajo del límite de detección de los métodos oficiales de control. El riesgo de una exposición crónica a pequeñas cantidades de estas toxinas debe ser tenido en cuenta a la hora de valorar la trascendencia para la salud humana de la actividad de promoción de crecimiento tumoral exhibida por este grupo de toxinas.

Si bien el proceso de depuración de las toxinas está potencialmente afectado por factores ambientales tales como la temperatura y disponibilidad de alimento, ninguno de estos factores pudo ser inequívocamente vinculado a la velocidad de depuración. Los resultados no dan lugar a conclusiones claras a este respecto por lo que podría concluirse que si la temperatura incide en la tasa de depuración lo hace de forma poco relevante. La salinidad tampoco parece afectar a la depuración. La tasa de depuración se incrementa con la concentración de fitoplancton, si bien el efecto registrado fue pequeño.

CAPITULO III

BIOENSAYOS PARA LA DETECCION DE TOXINAS MARINAS

INTRODUCCIÓN

El objetivo del trabajo que constituye el Capítulo III fue mejorar la capacidad de monitorización y control de las toxinas marinas en los moluscos mediante el análisis y valoración de los diferentes bioensayos disponibles para su detección.

En el caso de las toxinas DSP, objeto de esta tesis, no ha existido un protocolo único de bioensayo en ratón acordado y reconocido internacionalmente y que haya sido sometido a un proceso formal de estandarización y validación. Si bien es cierto que la mayor parte de los países que realizan el control de estas toxinas en los moluscos han venido utilizando ensayos *in vivo*, existen diferencias en cuanto al animal usado (rata o ratón albino), en cuanto al modo de administración de la toxinas (ingestión oral en el caso de la rata, o inyección intraperitoneal en el caso del ratón) y en cuanto a la naturaleza y proporción de los solventes utilizados para la extracción de las toxinas. Esto se ha traducido en una diferente especificidad, selectividad y recuperabilidad de los bioensayos y por tanto en una falta de equivalencia de los mismos, de tal manera que algunos protocolos pueden detectar todo el rango de sustancias lipofílicas bioactivas potencialmente presentes en los mariscos contaminados, mientras que la mayor especificidad de otros protocolos limita el espectro de toxinas detectables por los mismos. Existen igualmente discrepancias en cuanto a los criterios de positividad del ensayo.

En el presente trabajo que dio lugar al artículo 10 “**In vivo assays for phycotoxins**” se muestran los diferentes ensayos *in vivo* para la detección de toxinas DSP, evaluándose para cada uno de ellos propiedades tales como la especificidad, la selectividad y la recuperabilidad, así como el rango de toxinas detectables. Se discuten y valoran los criterios de positividad. El ámbito del estudio no se restringió a las toxinas del grupo DSP sino que se abarcaron también los ensayos *in vivo* utilizados para la determinación de toxinas PSP, NSP, Azaspirácidos, Espirólidos y Gymnodimina, valorándose su aplicabilidad, selectividad, sensibilidad, debilidades y fortalezas.

Al final del capítulo se presenta un resumen del artículo así como las conclusiones más relevantes del mismo.

ARTÍCULO 10

***In vivo* assays for phycotoxins.**

Fernández, M.L., Richard, D.J.A. and Cembella, A. D. In: Hallegraeff, G.M., Cembella, A.D. and Anderson, D.M., (eds.). Manual on Harmful Marine Microalgae. Paris. UNESCO Publishing. pp.347-380.

13

***In vivo* assays for phycotoxins**

M.L. Fernández, D.J.A. Richard and A.D. Cembella

13.1 INTRODUCTION

The phycotoxins of principal concern to seafood safety involving human health and ecotoxicology in marine trophic webs include a wide diversity of compounds produced primarily by eukaryotic microalgae and cyanobacteria. These biologically active compounds range from low molecular weight components, such as the secondary amino acid, domoic acid (mol. wt. = 312), to complex polycyclic macromolecules, e.g., the cyclic polyether, maitotoxin (mol. wt. = 3422). Many phycotoxic syndromes result from simultaneous exposure to several closely-related but structurally distinct toxin derivatives. Toxin potencies are also highly variable, not only between different classes of phycotoxins, but also among congeners of the same toxin family. Differences in toxin structure and potency, and complications introduced by complex organic matrices, clearly pose a challenge to the development and application of robust bioassays.

Whole animal bioassays provide a measure of total toxicity based upon the biological response of the animal to the toxins. Some oral feeding tests have been developed for phycotoxicity screening, and one such technique, the rat bioassay (Kat, 1983), is still used for DSP toxicity testing in a few European countries. Nevertheless, most mammalian bioassays for phycotoxins depend upon intraperitoneal (i.p.) injection of an extract of shellfish in an aqueous solution, or in a less polar solvent followed by evaporation and resuspension of the extract in a solvent compatible with injection. The choice of extraction solvent depends on the solubility properties of the toxins tested. Laboratory mice, which have been shown to react uniformly to toxins (e.g., Charles River CD-1 and CF-1, Swiss-Webster, etc.), are used routinely in phycotoxin bioassays. Following injection of the extract, subsequent observations are made to identify the time- and dose-dependent appearance of typical symptoms (morbidity and mortality) caused by the toxins. Toxicity values are generally interpolated from standard curves or tables, or from LD₅₀ determinations. Survival time of mice is generally used for the measurement of overall toxicity, expressed in mouse units (MU) that can be converted into toxin-specific units (e.g., µg saxitoxin equivalents [STXeq]) based upon the toxicity response when calibrated with toxin reference standards.

The principal advantage of a well-administered and properly calibrated mammalian bioassay, compared to physico-chemical analysis or many *in vitro* methods, is that the toxicity determination is directly proportional to human toxicity effects. Unfortunately, although this is true in theory, it is often difficult to accurately extrapolate results derived from an alternate route of toxin administration (often i.p. injection) to human oral potency. Yet such bioassays can often be rapidly and conveniently conducted without complex equipment or the extensive clean-up procedures often required for more sophisticated analytical methods. In addition, toxicity determination does not require availability of standards for all analogues of toxicological interest, as is the case with instrumental analytical methods. Mammalian bioassays also screen inadvertently for the presence of unknown or poorly defined toxic components in the extract matrix, which may ultimately be found to have human health significance. For example, the first indications of the toxicity associated with the ASP syndrome, later related to domoic acid (Wright et al., 1989), were revealed in the course of routine AOAC mouse bioassays for PSP toxicity using acidic aqueous mussel extracts. Skilled

bioassay analysts noted that the aberrant symptoms of ASP were distinguishable from the classic symptomology of PSP intoxication and consequent death.

Whole animal bioassays have numerous inherent and operational deficiencies when applied to the accurate quantitation of phycotoxins. High capital investment and maintenance costs are often associated with the installation and operation of bioassay facilities involving live animals, especially mammals. Whole animal bioassays are somewhat labour intensive to perform and cannot be readily automated. An additional drawback of mammalian bioassays is the high variability among laboratories, due mainly to a number of variables that can affect the results, such as specific animal characteristics (strain, sex, age, weight), general state of health, diet, stress conditions, pH of the injected extracts and environmental conditions, such as temperature, humidity, photoperiod. Most of these parameters acquire special relevance when sample toxicity levels are near the regulatory limit. For these reasons, careful monitoring and optimisation of the assay conditions is required to obtain reproducible and reliable assessment of toxicity and to reduce inconsistencies within and among laboratories. In the case of laboratories that are not equipped with the facilities needed to raise animals, they may be obtained from reliable and qualified suppliers. This requires careful planning so that animals of the proper size and condition are always available for assays. It should be noted that the use of laboratory animals is subject to regulations specifying the maintenance conditions (e.g., cage size, number of animals per cage, etc.), to assure quality of the results and welfare of the animals (EU Directive 86/609/CEE, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, NIH Pub. No. 85-24).

Mammalian bioassays are susceptible to a host of artifacts and inaccuracies that can bias the validity of the results. False results (positive or negative) can occur due to interference by substances coextracted during the sample preparation or to an inappropriate choice of extraction solvents or clean-up method. Many mammalian bioassays for phycotoxins have a poor dynamic range. Furthermore, dilution of the toxic analyte in the sample to achieve death times in the working range of the assay will also dilute other components in the matrix and this can lead to non-linearity of the standard dose-response curve. The assays tend to be more reliable for phycotoxins with small LD₅₀ values and short death times (i.e., high acute toxicity). Compared to instrumental analytical methods, whole animal bioassays are often much less sensitive (by up to five orders of magnitude) and precise ($\pm 20\%$ is typical under optimal conditions). For example, for the AOAC mouse bioassay for PSP toxicity, the acceptable regulatory limit for human consumption of shellfish adopted in many countries ($800 \mu\text{g STXeq kg}^{-1}$ soft tissue) is only twice the nominal toxicity detection limit (*ca.* $400 \mu\text{g STXeq kg}^{-1}$). This provides little security margin for technical errors. Moreover, no definitive qualitative information is provided on the nature of the toxin components. This is particularly a problem for samples that contain multiple toxin analogues that vary in specific toxicity, or where the co-occurrence of different phycotoxins can lead to synergistic or antagonistic biological responses, e.g. the simultaneous presence of a Na⁺ channel activator and a blocker. Nevertheless, despite the numerous technical and ethical problems inherent to mammalian bioassays and the poor information provided on specific toxin composition, such assays are widely employed for phycotoxin monitoring in seafood. For mammalian bioassays, only those that have been used in regulatory programs are presented in detail in this chapter.

13.2 PARALYTIC SHELLFISH POISONING (PSP)

Paralytic shellfish poisoning (PSP) is a neurotoxic syndrome resulting primarily from the blockage of neuronal and muscular Na⁺ channels. Binding to the Na⁺ channel prevents propagation of the action potential that is essential to the conduction of nerve impulse and muscle contraction. In vertebrates, the peripheral nervous system is particularly affected;

typical symptoms of poisoning include tingling and numbness of the extremities (progressing to muscular incoordination), respiratory distress, and muscular paralysis leading to death by asphyxiation in extreme cases. The PSP toxins include saxitoxin (STX) and approximately two dozen naturally occurring tetrahydropurine derivatives that vary in toxicity, chemical stability, and relative abundance in shellfish and dinoflagellates. These toxins may be divided into three groups: a) highly potent carbamate toxins, including (STX), neosaxitoxin (NEO), gonyautoxins (GTX1-GTX4), b) weakly toxic N-sulfocarbamoyl toxins (B1, B2, C1-C4), and c) decarbamoyl (dc-) analogues of intermediate toxicity (see Chapter 7) (Fig. 13.1). Analysis of these compounds in natural matrices is complicated by the presence of multiple components which vary in specific toxicity (by up to two orders of magnitude), the susceptibility to chemical conversion during sample processing or storage, and the potential for substantial bioconversion which can occur in shellfish tissues. Nevertheless, these differences in specific toxicity among the various toxin derivatives do not necessarily have to be considered when determining integrated toxicity using assay methods that purport to yield an estimate of net toxicity.

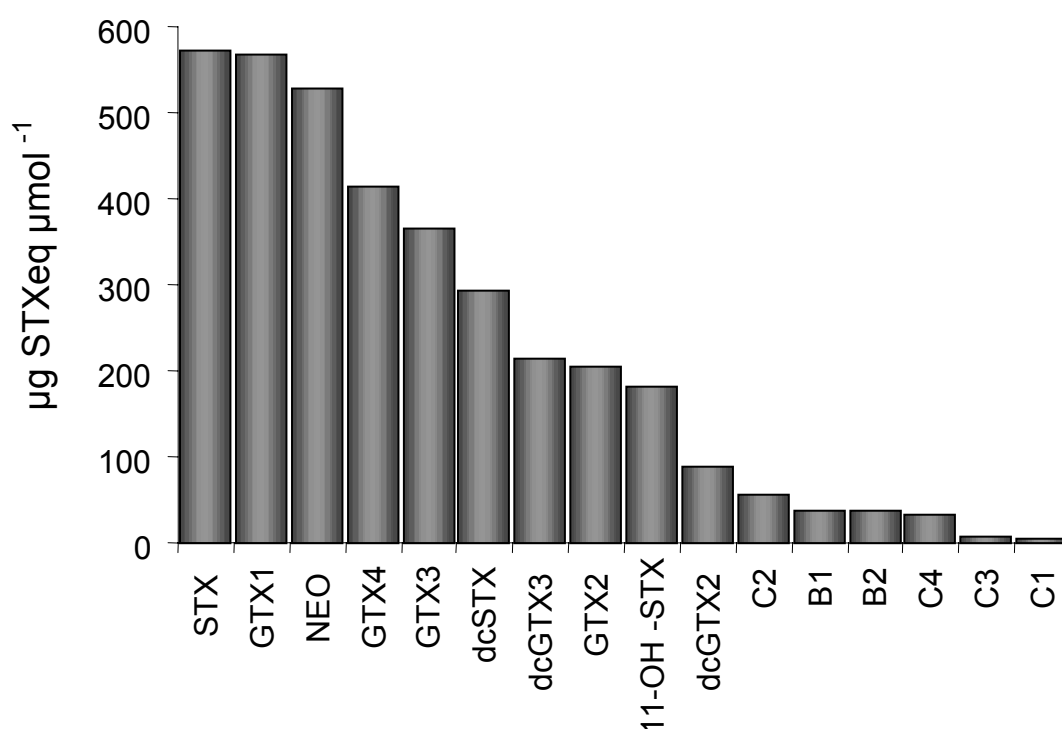


Fig.13.1 Specific toxicity of PSP toxin analogues (µg STXeq [saxitoxin equivalents] per µmol. Values calculated from corrected data (Y. Oshima, pers. commun.) originally published in Oshima (1995), based upon mouse bioassays performed with mouse strain ddY (sensitivity: 1 MU [mouse unit] = 0.23 µgSTXeq umol⁻¹). Abbreviations: STX = saxitoxin, NEO = neosaxitoxin, GTX = gonyautoxin, dc = decarbamoyl, 11-OH = 11-hydroxy.

13.2.1 AOAC mouse bioassay

The mouse bioassay for the determination of PSP toxicity was first applied by Sommer and Meyer (1937) to the assay of acidic extracts of mussels from California. In subsequent years, the general procedure was further standardized and validated in a series of inter-collaborative studies (McFarren, 1959). This reference method (AOAC, 1990) is the only procedure recognized internationally for quantifying PSP toxicity and it is used worldwide in PSP monitoring programs, albeit with some variation in the acceptable regulatory limit for toxicity.

The PSP mouse bioassay for shellfish toxicity involves acidic aqueous extraction of the tissue (whole animal or selected organs) followed by i.p. injection of 1 mL of the extract supernatant into each of three mice. The mice are observed for classical PSP symptoms, such as jumping in the early stages, ataxia, ophthalmia, paralysis, gasping, and death (usually in <15 minutes) by respiratory arrest. The time from initial injection to mouse death is recorded and the toxicity is determined (in mouse units [MU]) from Sommer's table. One mouse unit is defined as the amount of PSP toxin required to kill a 20 g mouse within 15 minutes. The bioassay is only quantitative when the mouse death occurs after 5 minutes. Samples with a mean death time of less than 5 minutes will require dilution so that death times of 5-7 minutes are achieved. For the inexperienced, several dilutions may be needed to obtain a result within this range. The precision of this assay is often given as $\pm 20\%$ (C.V.) (Hurst et al., 1985), but precision of <10% is achievable with properly trained assayists. Upon dilution, accuracy will improve because of the reduction in Na^+ levels naturally present in tissue.

Following a standardization procedure, mouse units may be converted to toxicity units ($\mu\text{g STXeq kg}^{-1}$) soft tissue. The tolerance level agreed upon by most countries is $800 \mu\text{g STXeq kg}^{-1}$ wet weight of edible tissue. Although the method has been extensively validated, there remain many caveats to be considered to minimize variability within and among laboratories. For this reason, bioassay standardization and periodic checking of the conversion factor (CF) is crucial. Interlaboratory comparisons are useful only if calibration with a known standard is carried out. The use of mouse units for comparison is ill advised because different strains of mice, environmental holding conditions, and assayist technique will affect the conversion values.

Another important parameter influencing the PSP toxin bioassay results is the pH during extraction. In the AOAC (1990) method, extraction in 0.1 M hydrochloric acid, followed by heating at 100°C , typically establishes a pH range between 2 and 4. Under the hot acidic conditions required in the AOAC protocol, a substantial proportion of the labile but low potency N-sulfocarbamoyl toxins (C1-C4, B1, B2) are converted to their respective high toxicity carbamate analogues (approximately 40-60% conversion, depending upon the tissue matrix buffering capacity, A. Cembella, unpub. data). Epimerisation also occurs with this hot acid treatment, resulting in the conversion of β - to α -epimers, but this usually has a minor effect on net toxicity. The PSP toxins are least stable at alkaline pH, yet heating under strongly acidic conditions (e.g., pH 2) can also lead to chemical transformation, with the degree of conversion depending upon the pH (Nagashima et al., 1991). Between pH 3 to 4, all PSP components are in a range of optimal stability. Low pH of the injected extract can also lead to mouse bioassay artifacts caused by acidosis. A decrease in the acceptable pH range established in the AOAC (1990) procedure is highly advisable in order to reduce variability and improve reproducibility of the assay.

A crucial issue to resolve when applying the mouse bioassay or any other toxicity assay to the determination of PSP toxicity in various matrices is to establish *a priori* what is to be measured - maximum potential toxicity, actual *in situ* toxicity, or the toxicity of the prepared extract, such as that yielded by the AOAC protocol. In addition to the *in vivo* conversion of PSP toxins in shellfish to more potent analogues, particularly via transformation of the low potency N-sulfocarbamoyl derivatives to carbamate analogues, such conversions may also occur during cooking or other processing of shellfish for human consumption. The precautionary principle seems to defend the use of the maximum potential toxicity approach, despite the possible overestimation of human health risk. In fact, the standard AOAC procedure determines toxicity according to neither extremes, but instead yields an intermediate value. In view of the inconsistent and incomplete hydrolysis of N-sulfocarbamoyl toxin derivatives in PSP toxin-containing samples extracted according to the AOAC method, some authors have recommended a ten-fold increase (to 1.0 M) in the hydrochloric acid concentration (Hall et al., 1990). When followed by heating of the extract, this modification yields toxin values that closely approximate the maximum potential toxicity,

but this approach has not been widely adopted since the standard AOAC (1990) procedure is strongly entrenched within regulatory structures. For human health protection, use of relatively mild acid hydrolysis afforded by the AOAC protocol is usually adequate, because of the predominance of carbamate toxins in most samples, and the fact that there is a margin of security inherent in the regulatory limit, even when low potency derivatives are dominant in the native toxin profile of the sample.

Many co-extracted substances can negatively affect biological assays, and the AOAC method is no exception. In early studies, Shantz et al. (1958) reported that high amounts of salts (mainly Na^+ ions) dissolved in the extracts can lower the apparent PSP toxicity in the mouse bioassay. Also, the addition of NaOH is sometimes necessary to raise the pH prior to injection, but this should be done carefully and drop-wise with stirring to avoid toxin decomposition via localized pH changes. The addition of excessive amounts of NaOH should be avoided.

The presence of high concentrations of certain metals is another potential source of interference with the PSP mouse bioassay. High levels of zinc (McCulloch et al., 1989; Cacho E., 1993) can induce mouse deaths with apparent neurotoxic symptoms. The major difference between zinc toxicity artifacts and symptoms of classic PSP toxicity is that death usually occurs more than 15 minutes after injection of zinc-contaminated extracts. High levels of magnesium (neurotoxic symptoms) and calcium (non-specific toxicant) can also cause mouse death using the AOAC method (D.A. Richard, unpubl. data). Depending upon the experience of the assayist, this effect could be falsely interpreted as low level PSP activity.

The mouse bioassay unambiguously gives evidence of the toxic potential of a sample, because the application of higher toxin concentrations shortens the time to death of the laboratory animals. However, these biological tests reveal only the total PSP toxicity of a sample, expressed in MU (mouse units) kg^{-1} or STXeq kg^{-1} (Fig. 13.2).

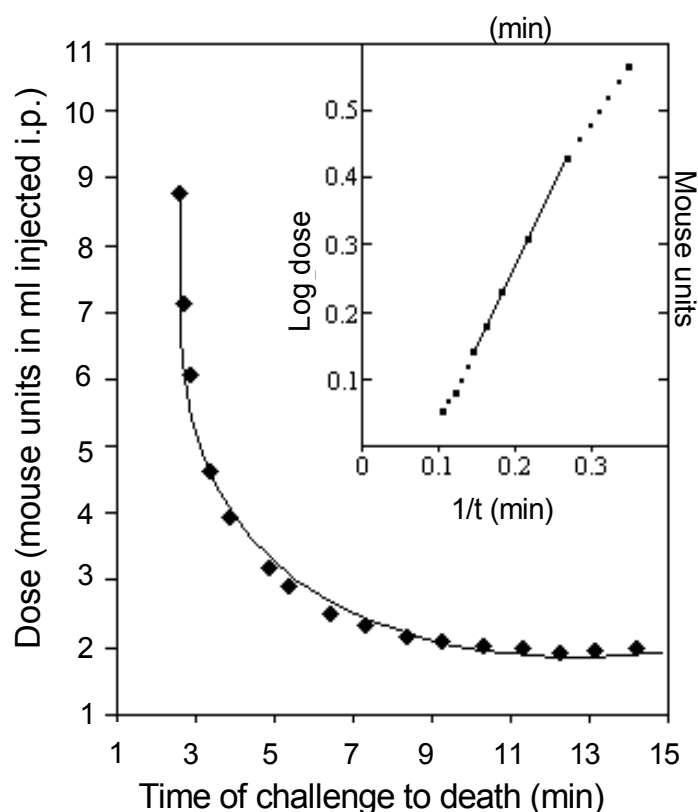


Fig.13.2 Relationship of the dose of PSP toxins to the time to death of mice (adapted from Luckas, 2000).

13.2.1.1 Mouse bioassay protocol

The following procedure is adopted with only minor modifications from the AOAC (1990) mouse bioassay protocol for PSP toxicity. *Caution: Rubber gloves should be used when handling materials that may contain PSP toxins.*

Reagents and Materials

1. Paralytic shellfish poison (STX) standard solution - $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (U.S. Food and Drug Administration), as acidified 20% alcohol solution. This standard is stable indefinitely when stored in a cool place.
2. Paralytic shellfish poison (STX) working standard solution - $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Dilute 1 mL of standard solution to 100 mL with H_2O . This solution is stable for several weeks at 3 to 4 °C.
3. Mice - use healthy mice (19 to 21g) from a standard stock colony for routine assays. For mice <19 g or >21 g, apply the correction factor (CF) to obtain the true death time (see Table 13.1). Do not use mice weighing >23 g and do not re-use assay subjects.

Table 13.1. Correction values for weight of mice.

Mouse Weight (g)	Mouse Units (MU)	Mouse Weight (g)	Mouse Units (MU)
10	0.50	17	0.88
10.5	0.53	17.5	0.905
11	0.56	18	0.93
11.5	0.59	18.5	0.95
12	0.62	19	0.97
12.5	0.65	19.5	0.985
13	0.675	20	1.000
13.5	0.70	20.5	1.015
14	0.73	21	1.03
14.5	0.76	21.5	1.04
15	0.785	22	1.05
15.5	0.81	22.5	1.06
16	0.84	23	1.07
16.5	0.86		

Standardization of Bioassay

Dilute 10 mL aliquots of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ standard STX solution with 10, 15, 20, 25 and 30 mL H_2O , respectively, until i.p. injection of 1 mL doses into a few test mice yields a median death time of 5 to 7 min. The pH of the dilutions should be between 2 to 4 and must not be >4.5. Test additional dilutions in 1 mL increments of H_2O , e.g., if 10 mL standard STX solution diluted with 25 mL H_2O kills mice in 5 to 7 min, test solutions dilutions as 10 + 24 mL and 10 + 26 mL as well.

Inject a group of 10 mice with each of two (or preferably three) dilutions which fall within the median death time of 5 to 7 min. Give a 1 mL dose to each mouse by i.p. injection and determine death time as the time elapsed from completion of injection to the last gasping breath of the mouse. Repeat the assay one or two days later, using dilutions prepared above which differed by 1 mL increments of H_2O . Then repeat the entire test, starting by testing dilutions prepared from fresh working standard solution.

Calculate median death time for each group of 10 mice injected with each dilution. If all groups of 10 mice injected with any one dilution gave median death times <5 or >7 min, disregard results from this dilution in subsequent calculations. However, if any groups of 10 mice injected with a given dilution gave median death times between 5 and 7 min. include all groups of 10 mice assayed at this dilution, even though some of the median death times may be <5 or >7 min. From the median death time for each group of 10 mice at each selected dilution, determine the MU mL⁻¹ from Sommer's Table (see Table 13.2). Divide calculated μg PSP toxin (STX) mL⁻¹ by MU mL⁻¹ to obtain the conversion factor (CF), expressed as μg PSP toxin (or μgSTXeq) per MU. Calculate the average CF value, and use this as a reference to verify routine assays. Individual CF values may vary significantly even within a given laboratory if the assay techniques and the condition of the mice are not rigidly controlled.

Verification of PSP Toxin Conversion Factor (CF) for Routine Assays

Check CF value periodically as follows: if shellfish tissues are assayed less than once a week, determine the CF value on each day assays are performed by injecting five mice with the appropriate dilution of working standard. If assays are carried out on several days during a given week, only one verification need be made per week using a dilution of standard such that the median death time falls within 5 to 7 min. The CF thus determined should agree with the average value within $\pm 20\%$. If the CF value does not lie within this range, complete the group of 10 mice by adding five additional specimens to the five already injected, and inject a second group of 10 mice with same dilution of standard. Average the CF determined for the second group with that of the first group - this is the new CF value.

Repeated checks of CF value normally produce results within $\pm 20\%$. If wider variations are found frequently, the possibility of uncontrolled or unrecognised variables in the technique or in the response of mice to PSP toxin should be investigated before proceeding with routine assays.

Sample Preparation and Extraction

- a) Clams, oysters, and mussels, etc. (whole tissues) - Thoroughly clean the outside of shellfish with fresh water. Open by cutting adductor muscles. Rinse inside with fresh water to remove sand or other foreign material. Remove meat from the shell by separating adductor muscles and tissue connections at the hinge. Do not use heat or anaesthetics before opening the shell, and do not cut or damage the soft tissues at this stage. Collect *ca.* 100 to 150 g of shellfish tissue in a glazed dish. As soon as possible, transfer tissues to a No. 10 sieve without layering, and drain for 5 min. Pick out pieces of shell and discard drainings. Grind tissues in household-type grinder with $1/8$ - $1/4$ " (3-6 mm) holes or in a blender until homogeneous.
- b) Scallops, etc. (selected tissues) - Separate edible tissues (e.g., adductor muscle) and apply the extraction procedure to this portion alone. Drain and homogenize as in Step a).
- c) Canned shellfish - Place entire contents of can (tissue and liquid) in a blender and blend until homogenous or grind three times through a meat chopper. For large cans, drain tissues for 2 min on a No. 8-12 sieve and collect all liquid. Determine wet weight of tissue and volume of liquid. Recombine portions of each sample in proportionate amounts and blend (or grind) until homogeneous.

Weigh 100 g of well-mixed sample into a tared beaker. Add 100 mL 0.1N HCl, stir thoroughly, and check pH (should be <4.0 , preferably *ca.* 3.0). If necessary, adjust pH as indicated in this section. Heat mixture and boil gently for 5 min, then let cool to room

temperature. Adjust cooled mixture to pH 2.0 to 4.0 (never >4.5), as determined by BHD Universal Indicator, phenol blue, Congo red paper, or by pH meter. To lower pH, add 5N HCl drop-wise with stirring; to raise pH, add 0.1N NaOH drop-wise with constant stirring to prevent local alkalisation and consequent destruction or conversion of PSP toxins. Transfer mixture to a graduated cylinder and dilute to 200 mL. Return mixture to the beaker, stir to homogeneity, and let settle until a portion of the supernatant is translucent and can be decanted free of solid particles large enough to block a 26-gage hypodermic needle. If necessary, centrifuge the mixture or supernatant for 5 min at 3,000 x g or filter through paper to obtain enough liquid to perform the bioassay.

Mouse Assay

Intraperitoneally inject each test mouse with 1 mL of acidic extract. Note the time of inoculation and observe mice carefully for the time of death as indicated by the last gasping breath. Record death time by stopwatch or clock with sweep second hand. One mouse may be used for the initial determination, but two or three are preferred. If death time or median death time of several mice is <5 min, prepare dilutions to obtain death times of 5 to 7 min. If death time of one or two mice injected with the undiluted is >7 min, a total of three mice must be inoculated to establish sample toxicity. If large dilutions are necessary, adjust the pH of the dilution by drop-wise addition of dilute HCl (0.1 or 0.01N) to pH 2.0 to 4.0 (never >4.5). Inoculate three mice with a dilution that gives death times of 5 to 7 min.

Calculation of Toxicity

Determine median death times of mice, including survivors, and from Sommer's Table 13.2 determine the corresponding toxicity in mouse units (MU). If test animals weigh <19 g or >21 g, apply a correction for each mouse by multiplying MU corresponding to death time by the weight correction factor; then determine median number of MU for this group. [*Consider death time of survivors as >60 min or equivalent to <0.875 MU in calculating the median.*] Convert MU to µg PSP toxin (STXeq) by multiplying by the CF value:

$$\mu\text{g STXeq kg}^{-1} \text{ tissue} = (\mu\text{g mL}^{-1}) \times \text{dilution factor} \times 2000$$

Consider any value >800 µg STXeq kg⁻¹ as hazardous and unsafe for human consumption.

13.2.2. Fly bioassay

The house fly (*Musca domestica*) bioassay (Ross et al., 1985) was developed as a viable alternative to the AOAC mouse assay for screening PSP toxins in shellfish. This method counters many of the disadvantages of the mouse bioassay, including those related to the high cost of mammalian bioassays, the difficulties in transporting and maintaining mice in acceptable facilities, animal rights concerns, and the interference due to salt effects. In brief, flies are temporarily immobilized on a cold plate and injected (in batches of 20) with standard AOAC extracts in a dilution series. After 10 minutes, flies are binary scored for motor ability – “0” = free-movement and/or ability to flip from dorsal position; “1” = positive, lack of motor ability. Interpretation of the results is based upon the fact that there is a linear relationship between the probit of the fraction of flies affected and the logarithm of the dose. The method proved to be reliable, with a mean ED₅₀ of 0.25±0.02 µg mL⁻¹ (381 pg per fly) when tested with USFDA certified STX standard. A collaborative study involving the assay of clam samples contaminated by PSP toxins and extracted according to the AOAC protocol was undertaken to compare the fly assay, the AOAC mouse assay, and a fluorescence-detection HPLC method.

Table 13.2. Sommer's table (959.08) relating mouse death times to toxicity units.

Death Time (min:s)	Mouse Units (MU)	Death Time (min:s)	Mouse Units (MU)
1:00	100	5:00	1.92
:10	66.2	:05	1.89
:15	38.3	:10	1.86
:20	26.4	:15	1.83
:25	20.7	:20	1.80
:30	16.5	:30	1.74
:35	13.9	:40	1.69
:40	11.9	:45	1.67
:45	10.4	:50	1.64
:50	9.33		
:55	8.42	6:00	1.60
		:15	1.54
2:00	7.67	:30	1.48
:05	7.04	:45	1.43
:10	6.52		
:15	6.06	7:00	1.39
:20	5.66	:15	1.35
:25	5.32	:30	1.31
:30	5.00	:45	1.28
:35	4.73		
:40	4.48	8:00	1.25
:45	4.26	:15	1.22
:50	4.06	:30	1.20
:55	3.88	:45	1.18
3:00	3.70	9:00	1.16
:05	3.57	:30	1.13
:10	3.43		
:15	3.31	10:00	1.11
:20	3.19	:30	1.09
:25	3.08		
:30	2.98	11:00	1.075
:35	2.88	:30	1.06
:40	2.79		
:45	2.71	12:00	1.05
:50	2.63	13	1.03
:55	2.56	14	1.015
		15	1.000
4:00	2.50	16	0.99
:05	2.44	17	0.98
:10	2.38	18	0.972
:15	2.32	19	0.965
:20	2.26	20	0.96
:25	2.21	21	0.954
:30	2.16	22	0.948
:35	2.12	23	0.942
:40	2.08	24	0.937
:45	2.04	25	0.934
:50	2.00	30	0.917
:55	1.96	40	0.898
		60	0.875

The fly bioassay showed a high degree of congruence with the mouse bioassay results, often with slightly higher values, but with a lower detection limit ($250 \mu\text{g STXeq kg}^{-1}$) for shellfish extracts than with the mouse bioassay (approx. $350\text{--}400 \mu\text{g STXeq kg}^{-1}$). Unfortunately, in spite of the fact that attempts were made to introduce the use of the fly bioassay, particularly in developing countries in Asia, this method never achieved common usage. Perhaps one of the difficulties is the high degree of manual dexterity required for the injection of minute quantities ($1.5 \mu\text{L}$) of sample into the abdomen-thorax junction without damage to the test subject.

13.3 AMNESIC SHELLFISH POISONING (ASP)

Amnesic shellfish poisoning (ASP), caused by the neurotoxin domoic acid, was first identified in Canada in shellfish extracts from eastern Prince Edward Island (Wright et al., 1989). The memory loss associated with extreme cases of human intoxication from shellfish contaminated by domoic acid led to the naming of the phycotoxic syndrome known as amnesic shellfish poisoning. Domoic acid is an excitatory amino acid derivative acting as a glutamate agonist on the kainate receptors of the central nervous system. This secondary amino acid is considered to be a more potent neuroexcitor than kainic acid, which when systemically injected into specific parts of the brain is known to have degenerative effects. Domoic acid is considered to be the primary toxin involved in ASP, although isomeric forms (e.g., iso-domoic acid) of lesser potency also occur naturally.

13.3.1 Bioassay protocols

The AOAC mouse bioassay for PSP toxicity can also detect domoic acid at concentrations *ca.* $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ injected. This procedure was initially used when ASP toxicity was first detected in leftover mussels implicated in human poisonings, and to direct the purification scheme in identifying domoic acid as the cause of ASP in shellfish extracts from eastern Prince Edward Island, Canada (Wright et al., 1989). The AOAC extraction procedure can yield substantial recovery of domoic acid from shellfish tissue (*ca.* 80%), and subsequent modification of the extraction method using methanol:water improves extraction efficiency but the tolerance level established in Canada and subsequently adopted by certain other countries is $20 \mu\text{g g}^{-1}$. Therefore the AOAC bioassay procedure is too insensitive to be used with confidence for regulatory purposes to quantify this toxin and it has been abandoned in favour of chemical analytical methods (see Chapter 8) by most regulatory authorities.

Under certain circumstances, a rat or mouse bioassay could be used to detect the presence of low level domoic acid by careful monitoring of selected symptoms (Tasker et al., 1990, Doucette et al., 2000), but such a method would not meet established criteria for regulatory purposes. In the event all other means of analysis are unavailable, special extraction techniques designed to increase sensitivity (e.g., extraction of the digestive gland only) can be used in combination with the mouse bioassay and observing for symptoms as described in this chapter. This method can only be described as qualitative at best and should not be used instead of the universally accepted chemical analytical methods.

The typical signs of the presence of domoic acid in the AOAC bioassay procedure are a unique scratching syndrome of the shoulders by the hind leg, followed by convulsions. Other clinical signs of domoic acid toxicity in mice, in the following general chronological order, may include: circling, head nodding, mastication, forelimb tremor, “wet dog” shakes, loss of postural control, profuse salivation, “praying” and rearing, scratching of the scapular region by the ipsilateral hind paw, myoclonic jerks, barrel rotation, generalized tremor, kyphosis, rigidity, general clonic-toxic convulsions, and death. The time of observation, as opposed to that of the AOAC procedure, must be extended to 4 hours. Mouse deaths associated with

mussels containing domoic acid were never observed after 135 minutes (Quilliam et al., 1989; Todd, 1990).

13.4 DIARRHETIC SHELLFISH POISONING (DSP) AND RELATED POLYETHER TOXIN SYNDROMES

Three groups of polyether compounds have been historically included in the “DSP toxin complex”: 1) okadaic acid (OA) and analogues such as the dinophysistoxins, DTX1, DTX2 and acyl-derivatives (DTX3), 2) pectenotoxins (PTXs) - separable into two groups, one having a cyclic ester structure (“macrolide”) and the other a “seco acid” group, in which the ester bond in the cyclic structure is hydrolysed, and 3) yessotoxins (YTXs), disulfated polyether compounds (see Chapter 8). These compounds have a relatively high molecular weight and share lipophilicity and solubility properties, being extracted with the same generic extraction procedures. The traditional DSP mouse bioassay involving acetone extraction (Yasumoto et al., 1978) can detect not only OA and DTXs, but also PTXs and YTXs that may co-occur with OA in phytoplankton and shellfish. For this reason, PTX and YTX have been often associated with “DSP”. However, their biological activity is different from that of the OA group, and only toxins belonging to the latter group have been reported to produce diarrhoeic effects in humans (i.e., classic DSP symptoms). There is general agreement in the classification of OAs and DTXs, as DSP toxins, but the inclusion of PTXs and YTXs in the “DSP complex” has always been a subject of great controversy. The toxicity values for various lipophilic phycotoxins found in shellfish and toxigenic microalgae are presented in Table 13.3.

In humans, typical symptoms following the consumption of DSP toxin-contaminated shellfish include acute diarrhea, nausea, vomiting and, in some cases, abdominal pain. Although no human mortalities from DSP have been reported, the affliction can be highly debilitating for several days. Okadaic acid and certain DTXs are potent inhibitors of at least two sub-classes of protein phosphatases (PP1 and PP2A) and this mode of action may be linked to the observed diarrhoea, degenerative changes in absorptive epithelium of the small intestine, and to tumor promotion (Fujiki et al., 1988). Toxicological and epidemiological data on PTX and YTX are scarce, and the action mechanism of these toxins has not yet been fully elucidated. By i.p. injection into mice, PTX1 has been shown to cause damage to the liver but no diarrhoea was observed (Terao et al., 1986). Pectenotoxin-2 is known to elicit extremely potent cytotoxic activities (at nM to pM concentrations) against numerous human cancer cell lines (Jung et al., 1995) and by oral administration into mice, can cause diarrhoea and severe injuries to the liver and intestine, with oral toxicity very similar to i.p. toxicity ($230 \mu\text{g kg}^{-1}$) (Ishige et al., 1988). As members of both the OA and PTX groups are produced by *Dinophysis* species, it is very difficult to assess separately the contribution of PTX to human intoxication. Recently, the presence of PTX2 seco-acid in shellfish was correlated with a toxic outbreak in Australia (Quilliam et al., 2000), but the co-occurrence of DTX esters makes this relationship to illness difficult to confirm.

With respect to YTXs, the i.p. lethal dose ranges from 100 to $500 \mu\text{g kg}^{-1}$, depending on the analogue, with the heart being the target organ (Terao et al., 1990). Oral toxicity is at least an order of magnitude lower than i.p. toxicity (Ojino et al., 1997; Aune et al., 2001). Diarrhoea has not been observed by oral administration, therefore the appropriateness of classifying these compounds as “DSP toxins” is questionable. Studies carried out with human lymphocytes suggest that YTX acts on cyclic adenosine monophosphate, increasing the cytosolic levels of calcium (De la Rosa et al., 2001).

Although the precautionary principle suggests that the presence of the three groups of toxins should be monitored in shellfish, there is no general agreement concerning which toxins should be included in the regulatory programmes (see Chapter 24). Furthermore, the definition of acceptable testing procedures, the standardization of methods and action limits to

be applied for regulatory purposes represents a difficult administrative and scientific challenge. The current situation is far from ideal, and leads to inconsistencies and a lack of equivalence between the toxin control approaches used by different countries.

Table 13.3 Acute toxicity of various lipophilic phycotoxins after i.p. injection into mice. Only those lipophilic toxins found in shellfish and the corresponding toxigenic microalgae are included; toxicity values for ciguatoxins and other analogues found primarily in fish tissues are available from Lewis (1995).

Toxin Group	Analogue	Toxicity ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Pathology
Okadaic acid	OA	200 ^a	diarrhoea; tumor promotion
Dinophysistoxin	DTX1	160 ^a	diarrhoea
	DTX3	500 ^a	diarrhoea
Pectenotoxin	PTX1	250 ^a	hepatotoxic
	PTX2	230 ^a	hepatotoxic; diarrhoea
	PTX3	350 ^a	*
	PTX4	770 ^a	*
	PTX6	500 ⁱ	*
	PTX7	>5000 ^j	*
	PTX8	>5000 ^j	*
	PTX9	>5000 ^j	*
	YTX	100 ^a	cardiotoxic
Yessotoxin	HydroxyYTX	500 ^b	*
	TrinorYTX	220 ^b	*
	HomoYTX	100 ^c	*
	45-hydroxyhomoYTX	500 ^c	*
	DesulfoYTX	500 ^d	*
	CarboxyYTX	500 ^e	*
Azaspiracid	AZA	200 ^f	diarrhoea
	AZA2	110 ^g	diarrhoea
	AZA3	140 ^g	diarrhoea
	AZA4	470 ^h	diarrhoea
	AZA5	1000 ^h	diarrhoea
Gymnodimine		96 ^k	unconfirmed
Brevetoxin	BTX-B1	50 ⁱ	neurological
	BTX-B2	300 ⁱ	neurological
	BTX-B3	>300 ⁱ	neurological
Spirolide	B	200 ⁱ	unconfirmed
	des-methyl-C	40 ^m	unconfirmed

Data from: ^aYasumoto et al. (1989); ^bSatake et al., 1996; ^cSatake et al., 1997; ^dDaiguji et al. 1998; ^eCiminiello et al., 2000; ^fSatake et al., 1998; ^gOfuji et al., 1999a,b; ^hOfuji et al., 2001; ⁱcited in Yasumoto, 2000; ^jSasaki et al., 1998; ^kMiles et al., 1999; ^lHu et al., 1995; ^mD.A. Richard, A.D. Cembella and M.A. Quilliam, unpubl. data.

*In the case of PTX and YTX groups, oral toxicity and cytotoxicity studies have been carried out only for PTX1, PTX2 and YTX. For other analogues, the pathology is likely to be similar or identical to that of the parent compounds, but is currently undefined.

13.4.1 Bioassay protocols

Despite the worldwide application of mammalian bioassays for DSP toxicity, there are large differences in the performance of the procedures and in the classification criteria employed among countries. Assay selectivity, specificity, and DSP toxin recovery depends greatly upon the selection, purity, and ratios of the organic solvents used for extraction and clean-up steps (see also Chapter 8). Bioassay procedures as diverse as the oral dosage rat bioassay and the i.p. injection mouse assay are not strictly homologous, because the former technique quantifies only the diarrhoeagenic effect of certain DSP toxin components (OA and analogues), whereas the latter assay yields an estimate of overall "DSP toxicity". Most extraction procedures applied to DSP toxins in shellfish samples can also coextract NSP toxins and certain other lipophilic ichthyotoxins that can yield non-specific artifacts in mammalian bioassays. There may also be interference by free fatty acids, which can vary with the particular shellfish species, as well as spatially and temporally. These components may be toxic to mice by i.p. injection, yielding false positive reactions for "DSP toxicity", but innocuous orally to humans and negative by the rat oral bioassay (Takagi et al., 1984; Lawrence et al., 1994).

The mouse bioassay for DSP toxicity is considered to be quantitative, although as the prolonged observation time would suggest, it is less reliable as a determinant of acute toxicity than is the corresponding AOAC mouse assay for PSP toxicity. Furthermore, the precise cause of death in rodents by i.p. administration of DSP toxins is not yet known. Phosphatase inhibition activity is strongly indicated as the toxicity mechanism leading to death, but the results of the i.p. bioassay cannot be simply extrapolated to quantify human oral toxicity or diarrhoeic symptoms.

The DSP toxicity procedure as originally established (Yasumoto et al., 1978) involved the calculation of i.p. toxicity in mouse units (MU), with 50 MU kg⁻¹ of whole soft tissue accepted as the regulatory limit in Japan. A mouse unit was defined as the minimum quantity of toxins required to kill two of three mice within 24 hours of i.p. injection; this corresponds to 3.2 µg DTX1 or 4 µg OA for the ddY mouse strain used in Japan, but may vary somewhat with the strain. As the calculation of toxicity using LD₅₀ methods can be labourious and time-consuming, regulatory laboratories in most countries currently use mouse survival time for the evaluation of DSP toxicity. There is no international consensus on the appropriate observation period - the acceptable criteria can vary from "two of three mouse deaths in less than five hours" to "two of three mouse deaths in less than 24 hours". Such decisions are both operational and administrative, but they are also somewhat dependent upon the specific procedure for sample preparation prior to mouse bioassay, since various components of differing toxicity may be selectively extracted.

On the basis of an interlaboratory study of the mouse bioassay (adult mice) and the suckling mouse test (Marcaillou-Le Baut et al., 1985), the survival time considered as a positive result (adult mouse assay) was reduced from 24 to 5 hours. The study showed that the survival time of adult mice beyond 5 hours corresponded to a toxicity lower than that revealed by the suckling mouse test, and that the survival three of three mice for more than 5 hours was considered a negative response. In addition, the same investigators studied the relation between the survival time of three mice and OA concentration for observations of death time more than 5 hours, and found that <4 µg OA in an extract matrix was necessary to yield a death time greater than 5 hours. Consequently, a mouse survival time of more than 5 hours was considered lower than the regulatory action level, and therefore a negative result for DSP toxicity (Marcaillou-Le Baut and Masselin, 1990).

Further studies comparing mouse bioassay results and HPLC-FD determination of OA showed that survival times of around 5 hours corresponded with an OA concentration of approximately (and in some cases above) 2 mg OA kg⁻¹ of hepatopancreas. Vieytes et al. (1996) showed a relation between the death times in the mouse bioassay and values obtained in HPLC analysis. An analysis of 127 samples by both methods showed that reduction of the observation time from 24 to 5 hours could increase (by 35-76%) negative bioassays for toxin levels between 2 and 3 mg OA kg⁻¹ of hepatopancreas. Vale and Sampayo (1996) found that although death times between 5 and 24 hours usually corresponded to OA + DTX2 concentrations of about 2 mg OAeq kg⁻¹ of hepatopancreas, in some samples, appreciable amounts of DSP toxins (>2 mg OAeq kg⁻¹ of hepatopancreas) resulted in survival times longer than 5 hours.

When evaluating the level of consumer protection provided by the different toxicity criteria, the considerable degree of uncertainty associated to the mouse bioassay protocols should be taken into account. Although the purpose of the assay is to assess toxicity of the edible part of the molluscs (usually the whole body of soft tissues), the assay is normally carried out using the hepatopancreas as the analytical sample, assuming, with reference to abundant previous data on toxin distribution in tissues, that most DSP toxins are accumulated in the digestive tissues. Although the digestive tissues (primarily hepatopancreas) accumulate most of the DSP toxins, a certain amount can be retained in other soft tissues (gill, mantle, siphon, gonads, etc.). When considering the percentage of hepatopancreas to whole shellfish soft tissues, significant inter- and intra-specific differences are evident, and the percentage will also depend on the season and location for a given species (hepatopancreas percentage variations of between 7 and 25 % are routinely observed). Figure 13.3 shows the DSP toxicity results expressed in relation to whole shellfish body weight of soft tissues that corresponds to the different survival times used as the toxicity criterion.

These data are based on the assumption that when mice are injected with an extract equivalent to 5 g of hepatopancreas, a survival time of 24 hours corresponds to 0.8 mg OAeq kg⁻¹ and a survival time of 5 hours corresponds to 2 mg OAeq kg⁻¹. By introducing different possible percentages of hepatopancreas in relation to whole shellfish soft tissue weight, different results are obtained. If a range of between 10 and 25% is considered, a survival time of 24 hours would correspond to a toxicity between 80 and 200 µg OAeq kg⁻¹ whole shellfish soft tissue, whilst a 5 hour survival time would correspond to a toxicity value of between 200 and 500 µg OAeq kg⁻¹, concentrations very close to or even higher than those reported to produce diarrhoea (total dose of 40-48 µg OA).

Evidently, when DSP toxins other than OA, DTX1 and DTX2 are present in shellfish, the time/dose response may vary, and a delay in the appearance of the symptoms may occur. This is the case for DTX3, for which an observation time of 24 hours is required (Terao et al., 1993). Therefore, although the use of a 5-hour mouse test for DSP toxicity may improve the accuracy of the assay, it also increases the likelihood that shellfish with toxic levels of DSP analogues being accepted and placed on the market.

The assays described in the subsequent section are used for DSP toxicity determination in different countries, but the range of substances detected as well as the sensitivity may differ among protocols. These facts should be taken into account when making a decision on which method to use. Albeit in worldwide use for many years, none of these procedures has been evaluated in a formal collaborative study and although information on detection limit is in some cases available, performance characteristics, such as accuracy and precision are not fully known.

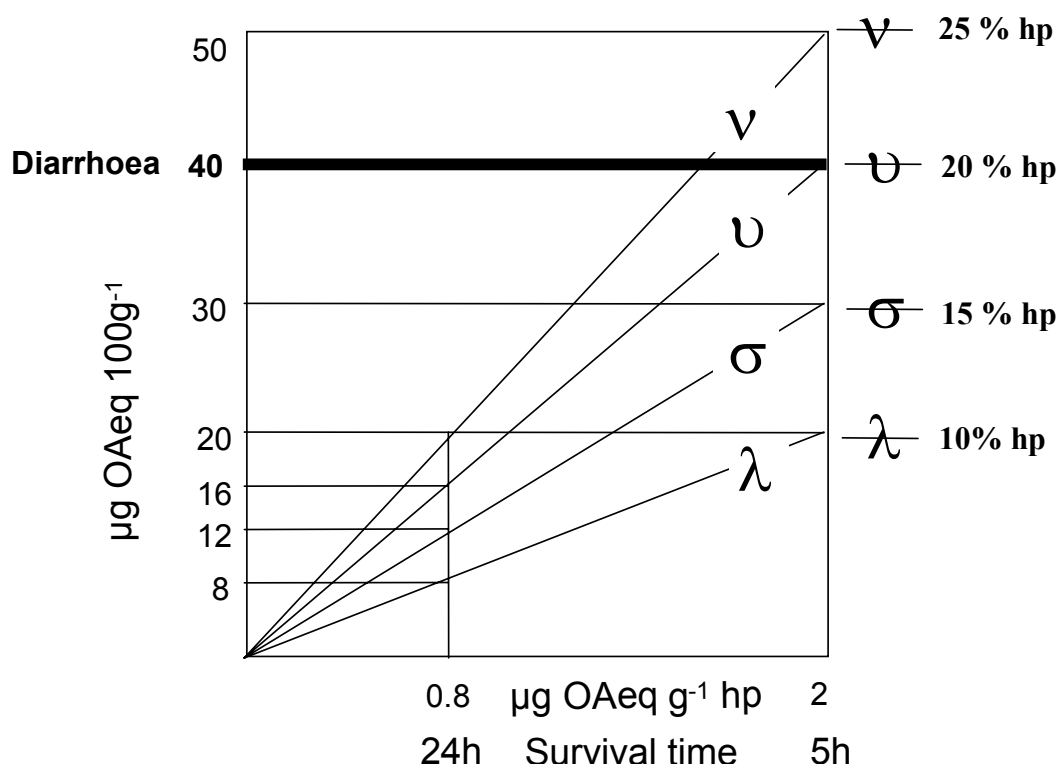


Fig.13.3 DSP toxicity ($\mu\text{gOAeq } 100\text{g}^{-1}$ whole body weight of soft shellfish tissues) in relation to mouse survival time after intraperitoneal (i.p.) injection for different percentages of hepatopancreas (% hp) of whole body soft tissues. The onset of diarrhoea in humans would typically occur after the ingestion of about 40 μg OAeq.(adapted from Miguez et al., 1998).

13.4.1.1. Rat bioassay

The rat bioassay (Kat,1983) is an oral toxicity test in which the presence of DSP toxins is indicated by feeding pre-starved (for 24h) white female Wistar rats, *Rattus norvegicus* (100-120 g), with 10 g of shellfish hepatopancreas. On the following day, the consistency (diarrhoeic or soft) of the rat faeces is scored: normal (0 or -), normal to soft (1 or +), soft (2 or ++), soft to diarrhoeic (3 or +++), and diarrhoeic (4 or ++++). Faeces consistency other than normal suggests the presence of DSP toxins in the sample. If the toxicity score is above 0, shellfish are usually considered as unsafe for human consumption. The detection limit of the assay is around 800 μg OA equivalents kg^{-1} of hepatopancreas.

The rat bioassay simulates the mode of human intoxication, and the symptoms exhibited by rats are similar to those resulting from ingestion of the diarrhoeagenic DSP toxins by humans. Therefore, the rat bioassay is a biologically "realistic" model of acute toxicity, and presents the additional advantage of not involving extraction of toxins, thus avoiding the possibility of low recoveries.

There are, however, serious limitations associated with this bioassay procedure. At best, the assay is only semi-quantitative and the dynamic range is poor. Due to broad individual variation in sensitivity and symptomology among rats, the precision is also questionable, particularly when few animals are assayed (typically one to three rats). The assay is reasonably diagnostic for the presence of the diarrhoeagenic DSP components (OA and DTX analogues), but PTX and YTX are not detected in this method. Since the assay method is not

very specific, other diarrhoeic agents including intestinal pathogens associated with poor animal health could also complicate the interpretation of faeces consistency.

13.4.1.2. *Intraperitoneal mouse bioassays*

All of the mouse bioassay protocols detailed in this section require prior extraction and concentration of the lipophilic components by liquid/liquid partitioning. An advantage of the extraction protocols based upon liquid/liquid partitioning of toxin components is that by modifying the acetone volumes used for the initial extraction, the protocols can be applied to DSP toxin determination on whole shellfish soft-tissues. This can be very useful in the case of small shellfish species or when extracting eviscerated specimens. The acetone volumes required may vary depending upon the shellfish species, but 100 g of homogenized whole shellfish tissues are usually used as the minimum test portion. When using whole shellfish soft tissues, the accuracy of the assay improves. However, the high volumes of organic solvents required, the laboriousness of the procedure and the toxicity of the solvents used in the partitioning, have limited the wide application of this approach in monitoring programs that require the analysis of a high number of samples. Nevertheless, it is worth mentioning that a mouse bioassay procedure based upon extraction of whole soft tissues is used for NSP/DSP toxicity screening in New Zealand (described in Section 13.5.1.2). When inoculating mice with an extract corresponding to 25 g of whole soft tissues and using a 24 hour observation period, the detection limit of the assay is approximately 40 MU kg⁻¹ or 160 µg OAeq kg⁻¹.

13.4.1.2.1. *Method 1*

The original mouse bioassay procedure of Yasumoto et al. (1978) was developed for bioassay-guided fractionation of toxic extracts, but it is widely applied for routine monitoring of DSP toxicity in shellfish. According to this method, a 20 g sample of homogenized hepatopancreas is extracted with 50 mL of acetone. The slurry is filtered into an evaporation flask and the tissue residue re-extracted twice with volumes of 50 mL of acetone and the filtrates combined. The solvent is removed by rotary evaporation under reduced pressure and the residue is resuspended in 1% Tween 60 to a final concentration of 5 g equivalents mL⁻¹. One mL of this solution is injected intraperitoneally into each of three mice weighing between 18 and 20 g, the mice observed for 24 to 48 hours, and toxicity determined on the basis of the survival time. The calculation of mouse units may require serial dilution of sample extracts until the minimum dose that produces death in 24 hours is reached. Under the conditions described here, the detection limit of the assay is 0.2 MU g⁻¹ or 800 µg OA equivalents kg⁻¹ hepatopancreas.

This procedure detects the presence of OA and DTXs, as well as the PTX and YTX groups. In addition, other lipophilic toxins, such as spirolides, gymnodimine, azaspiracids, brevetoxins and ciguatoxins are co-extracted, if present in shellfish. Mouse symptoms and death times may be similar depending on the bioactive compounds present in the samples, and in some circumstances it may be difficult to discriminate which substances are the cause of death of the mice.

A potential pitfall of this bioassay procedure is associated with the aqueous-lipid residue obtained after solvent evaporation. Depending upon factors such as water content of the shellfish, resuspension of the final residue to achieve a specific concentration (5 g hepatopancreas mL⁻¹ Tween 60) may be inconsistent, thereby negatively affecting the accuracy of the assay. The high temperatures sometimes required for the total removal of the water may also produce low toxin recoveries (Crocì et al., 1994).

Interference by low levels of PSP and ASP toxins, even at concentrations undetectable by the AOAC (1990) mouse bioassay, can also present problems. Some of these polar

components can be coextracted along with DSP toxins by acetone extraction, and they are concentrated during the evaporation procedure, yielding a final extract that can be highly toxic to mice. Fast mouse deaths (minutes to a few hours) with neurotoxic symptomology do not permit the prolonged observations required for DSP toxin detection. The presence of certain free fatty acids can also interfere with this assay (Takagi et al., 1984).

Among all the bioassays for DSP detection, this method is the least selective, and when positive results are obtained, it is not always feasible to assign the response to the presence of known toxins. However, after many years of routine application throughout the world, it has been proven to be reasonably effective to screen for the presence of DSP and other polyether toxins, and for public health protection.

13.4.1.2.2. *Method 2*

In this modified method (Yasumoto et al., 1984), a 20g sample of homogenized hepatopancreas is extracted thrice with 50 mL of acetone. The extracts are filtered, then the filtrate is collected and the solvent removed by rotary evaporation. The residue is made up to 15 to 20 mL with water and the suspension is extracted thrice with 50 mL of diethyl-ether. The combined organic layers are backwashed twice with small quantities of water and evaporated to dryness. As in the original procedure described in Method 1, the residue is resuspended in 1% Tween 60 to a concentration of 5 g equivalents hepatopancreas mL⁻¹ Tween 60 prior to i.p. injection. Toxicity is determined on the basis of the survival time or in mouse units.

The assay is very suitable for use with a wide variety of shellfish tissues. With this procedure, possible interferences with PSP and ASP toxins are removed in the water layer. High amounts of salts that are concentrated during the evaporation step, and could cause artifactual mouse deaths, can also be removed during the water:ether partitioning step.

A drawback of this extraction procedure is the poor solubility of YTX in diethyl-ether; depending upon the pH and lipid content of the sample, this toxic component may be lost in the water layer. A substantial improvement in YTX recovery is achieved if dichloromethane or ethyl acetate is used instead of diethyl-ether.

13.4.1.2.3 *Method 3*

The extraction procedure for this DSP mouse bioassay method was adapted from that applied for the validation of the HPLC-FD method (Lee et al., 1987)). In this protocol, homogenized hepatopancreas is extracted with 100% acetone. After evaporation of the solvent, the residue is redissolved in 80% methanol, which is extracted twice with petroleum ether to remove contaminant non-polar lipids and then with chloroform. The chloroform phase is evaporated to dryness and the residue is redissolved in 1% Tween 60 to be administered by i.p. injection into mice. One mL portions of this solution are administered into each of two mice at doses equivalent to 2.5 to 5 g of hepatopancreas. Mouse behaviour and survival time is recorded for a 24-hour period. Losses of low polarity DSP toxins (DTX3) can occur during the petroleum ether washing step.

13.4.1.2.4 *Method 4*

In this procedure (Le Baut and Masselin, 1990), hepatopancreas (20g) is extracted thrice with 100% acetone and the filtrates collected. After evaporation of the acetone, the residue is resuspended in 25 mL of methanol:water (80:20). The methanolic phase is washed twice with 25 mL of hexane, the hexane phases are discarded, and the methanolic layer is evaporated to dryness. The resuspension of the residue in 1% Tween 60 and i.p. injection protocols are identical to those described for the methods in Sections 13.4.1.2.1, 13.4.1.2.2 and 13.4.1.2.3.

One of the main advantages of this assay is that low polarity free fatty acids that could interfere with the assay are removed by the hexane wash. The final residue has a relatively low lipid content and it is thus easier to accurately resuspend in Tween 60, resulting in fewer false positive responses.

The main deficiency of the procedure is that the hexane washing step, besides removing free fatty acids, also preferentially solubilises DTX3, the acyl-derivatives of OA and DTX. If these components are present in shellfish samples, substantial loss of toxins can occur (Fernandez et al., 1996). PSP toxins and interfering salts are not removed in this procedure.

13.4.1.3. *Suckling mouse bioassay*

The suckling mouse bioassay, a method usually applied for detection of bacterial enterotoxins, has been used to test the enteropathogenicity of OA, DTX1 and DTX3 (Hamano et al., 1986). The procedure involves the intragastric introduction via Teflon tubing of 0.1 mL of shellfish extracts suspended in 1% Tween 60, to four- to five-day old mice. After the treatment, the mice are kept at 25 °C for 4 hours and then sacrificed with chloroform. The whole intestine is removed and the fluid accumulation ratio (FA) is determined as the ratio of the weight of intestine to that of the remaining body: $FA = \text{gut weight}/(\text{body weight} - \text{gut weight})$.

The detection limit of the test is lower than that of the i.p. mouse bioassay, and positive results can be observed at a level of 0.1 MU, corresponding to an FA value of 0.09. Pectenotoxins, YTXs and free fatty acids are not detected by this procedure. Although under optimal conditions results can be obtained within 4 hours, with a sensitivity higher than that of the mouse assay, accuracy and precision is a concern and the assay is difficult to be applied routinely. For example, wounding of the mice can take place during administration of the sample.

13.4.1.4. *Daphnia magna* bioassay

Daphnia magna is a fresh water cladoceran invertebrate traditionally used as a standard ecotoxicological indicator organism for the testing of different toxicants. A *D. magna* bioassay was developed by Vernoux et al. (1993) for OA screening of mussel extracts, based on the measurement of the inhibition of *Daphnia* mobility due to the presence of OA. The test is carried out in glass tubes each containing 10 mL of growth medium and five *Daphnia* individuals. Standardized culture conditions are crucial to avoid variability of responses. A linear correlation ($r = 0.74$) has been established between results of the *Daphnia* bioassay and an HPLC-FD method involving pre-column derivatization. As a larger number of animals can be used, precision can potentially be higher than that of the mouse bioassay, and sensitivity is ten times higher. In addition to OA, other co-extracted lipophilic toxins may be detected. Although the method was proposed as an alternative to the mouse assay for OA screening, there have not been further reports on its application. It is therefore difficult to assess its value as a tool for routine DSP toxin monitoring.

13.5 NEUROTOXIC SHELLFISH POISONING (NSP) TOXINS

The toxins implicated in neurotoxic shellfish poisoning (NSP), known collectively as "brevetoxins", are considered to be primarily ichthyotoxins. In humans, the symptoms of NSP intoxication include respiratory distress, as well as eye and nasal membrane irritation, caused principally by exposure to sea-spray aerosols and by direct contact with toxic blooms while swimming. The brevetoxins are also accumulated in shellfish, which when consumed by humans, cause a toxic syndrome somewhat similar to PSP intoxication. Many of these lipid-soluble cyclic polyether compounds have been characterized, including brevetoxins A, B

and C (BTX A, B and C) [synonyms: PbTx-1, PbTx-2 and PbTx-8, respectively], GB3, 5 and 6 [synonyms: PbTx-3, PbTx-4 and PbTx-5, respectively] and PbTx-6 and PbTx-7, but undoubtedly there exist other undescribed derivatives. Due to the chemical lability of the brevetoxins, analysis of these compounds continues to be problematic (see also Chapter 8). All of these derivatives exert their toxic effect by specific binding to site-5 of voltage-sensitive Na^+ channels, leading to channel activation at normal resting potential.

13.5.1 *Bioassay protocols*

13.5.1.1 *APHA protocol*

The official method for the determination of NSP toxins is the American Public Health Association (APHA, 1985) procedure (originally Irwin, 1970), based on a diethyl-ether extraction of shellfish tissue. The APHA protocol for NSP is used extensively in the United States, where the problem of NSP is most prevalent and acute.

Apparatus

- Electric blender
- Analytical balance
- Hot plate
- Explosion-proof centrifuge with 250 mL centrifuge cups; covered with foil
- Explosion-proof chemical hood
- 1000 mL separatory funnel
- 400 mL beakers.
- Disposable syringes with 26-gauge needles (do not reuse)
- Stopwatch, mechanical or electronic, registering to at least 1 s

Reagents

- Hydrochloric acid (HCl), concentrated
- Sodium chloride (NaCl)
- Cottonseed oil
- Diethyl ether, anhydrous, AR (ACS). Use ether only from a previously unopened container- peroxides reduce apparent toxicity.

Test Animals

Healthy albino male mice (Swiss-Webster strain) weighing 20 ± 1 g are preferable, however, mice weighing between 15 and 25 g may be used. Do not reuse surviving mice. Since mice often eat excessively and may store 1 to 2 g of food in the digestive tract, feed them sufficiently but do not overfeed.

Sample Preparation and Extraction

Clean, shuck, and drain shellfish. The number of shellfish required for 100 g of homogenate varies from two large clams to eight to 10 small oysters. Homogenize shellfish tissues in an electric blender at high speed for 5 min. Weigh 100 g of homogenate into a pre-weighed 400 mL beaker and add 5 g NaCl and 1 mL conc. HCL. Stir well. Heat mixture to boiling and cook for 5 min; stir frequently. Let cool to room temperature and transfer to a 1000 mL separatory funnel. Rinse beaker with ether and add rinse to separatory funnel. Perform all subsequent steps under an explosion-proof hood.

Add 100 mL ether to homogenate, stopper, and shake vigorously (venting frequently) for 5 min. Centrifuge at 2000 rpm for 15 min. Carefully decant upper clear yellow ether phase into a 1000 mL separatory funnel, keeping solids in the centrifuge bottle. Repeat extraction three more times until the total amount of ether used is 400 mL. Drain off and discard any bottom

layer containing small shellfish pieces and/or water emulsion so that only the ether phase remains. Transfer ether extract to a 400 mL beaker pre-weighed to the nearest 0.01 g. Let ether evaporate in air under the hood until no trace of ether fumes is discernible. An oily residue, which is the crude toxin extract, will remain. Cover tightly and freeze for later bioassay.

Mouse Assay

Bring weight of crude toxin residue to 9.17 g with cottonseed oil. The volume of oil and toxin mixture represents 10 mL. Thoroughly mix and break up remaining pieces of insoluble matter as possible with a stirring rod.

Slowly fill syringe (with needle in place) with 1 mL of residue-cottonseed oil mixture. Carefully inject (i.p.) 1 mL into each of two weighed mice on the ventral side anterior to the hind leg. If more than one drop of injected mixture leaks from the mouse, reject the mouse and inject another. Record time of injection. If the two mice survive for 2 h, inject three more mice with 1 mL of residue-cottonseed oil mixture or if the two mice die in less than 2 h, make dilutions until the injection solution causes the death of two mice in 2 to 6 h. [Note: the recommended dilution is 1:1.25, made by adding 2 mL cottonseed oil to the remaining 8 mL of residue-cottonseed oil mixture.] Repeat dilutions if necessary. When the correct dilution is found, inject three more mice.

Observe mice continuously for 6 h. The death time is the time elapsed from injection to the last breath of a mouse. The eyes will darken immediately upon death. If mice survive for 6 h, hold them for a total of 24 h. For a 6 h continual observation period, the lower limit of the assay sensitivity is 200 MU kg⁻¹ shellfish tissue. Extending the continuous observation period to 15.5 h will increase the assay sensitivity to 100 MU kg⁻¹ shellfish. If mice die following continuous observation but within the 24 h period, toxin is present in low quantity.

Death may not occur during an assay, yet physiological signs of NSP toxicity may be observed. The common signs of low NSP toxicity (non-lethal) are weakness of the limbs, imbalance, occasional respiratory spasms, and prolonged lethargy. Acute toxic signs include front and hindquarter paralysis resulting in instability, laboured breathing, prostration, or hyperactivity. To observe non-toxic behaviour for comparison, inject two mice with only cottonseed oil to serve as controls. The relationship of dose to death time of mice injected i.p. with NSP toxins, along with weight correction factors, is presented in Table 13.4.

Toxicity Calculations

Using Table 13.4, calculate the corrected MU activity using the following formula: MU X weight correction X dilution X 10 = MU kg⁻¹ shellfish. If additional dilutions were not made, use the ten-fold dilution factor - based on the initial addition of cottonseed oil to 10 mL. If additional dilutions were made, multiply these factors also. Interpolate death times and weight corrections that fall between table values. Example: If a 22.3 g mouse died in 390 min, using the original dilution, then the MU kg⁻¹ = 1.9 X 1.14 X 10 X 10 = 217.

If mice die after continuous observation, calculate MU as though death occurred at the end of the continuous observation period. Report results as an indeterminate value of "less than"(<), i.e., less than the sensitivity of the test for that time period. If mice survive the 24 h period, assign a value of <10 MU, because the lowest, reproducible sensitivity of the assay is 100 MU kg⁻¹ shellfish meat.

Calculate the mean MU if 100% mortality occurs and death times are determinate, or determine the median MU if <100% mortality is observed or if death times are indeterminate. When reporting indeterminate toxicity, note the number of mice that died in 24 h, or if no mice die in 24 h, report toxin as undetectable (<100 MU kg⁻¹ shellfish meat). Consider any detectable level of toxin per kg shellfish tissue as rendering the shellfish potentially unsafe for human consumption

Table 13.4. Relationship of dose to death time and weight of mice injected i.p. with NSP toxins (brevetoxins) extracted from shellfish.

Death time (min) (20 g mice)	Mouse Units (MU mL ⁻¹)	Mouse Weight (g)	Weight Correction Factor
8	10.0	15	0.69
10	9.0	16	0.75
12	8.0	17	0.81
14	7.0	18	0.87
16	6.0	19	0.94
18	5.0	20	1.00
20	4.5	21	1.06
30	4.0	22	1.12
38	3.8	23	1.18
45	3.6	24	1.24
60	3.4	25	1.30
83	3.2	26	1.36
105	3.0		
140	2.8		
180	2.6		
234	2.4		
300	2.2		
360	2.0		
435	1.8		
540	1.6		
645	1.4		
780	1.2		
930	1.0		

13.5.1.2 *New Zealand protocol*

After the emergence of NSP in New Zealand in 1993, a management strategy to monitor these toxins together with DSP toxins was developed by the MAF Regulatory Authority. The sample preparation method used for the screening of NSP and DSP toxins is based on acetone extraction of these lipophilic components, followed by partitioning into dichloromethane (Hannah et al., 1995). Death of two of three mice within 6 hours is indicative of the presence of NSP or DSP toxins. In this protocol, the presence of DSP toxin is confirmed using an ELISA test and NSP levels are confirmed by the official APHA method, to avoid interferences due to gymnodimine (see Section 13.6.3).

Materials and Equipment

- High speed flame proof blender
- Blender cups and lids
- Whatman 541 filter paper
- Cotton wool
- Round bottom flasks - 500 mL and 1000 mL

Separating funnels - 500 mL

Rotary evaporator

Buchner funnels and flasks

Glass vials - 20 mL

Balance

Hot plate

Solvents:

Acetone, analytical reagent (AR) grade

Dichloromethane (AR)

Sodium sulphate (anhydrous AR), heated in a muffle furnace at 400 °C for 16 h

Sterile Tween 60/Saline, 1%:0.85%. Sterilised by autoclaving.

Healthy mice weighing 20 ± 2 g

Syringes with 26 to 23 gauge needles.

Stopwatch

Coloured paints/markers for coding mice.

Extraction Procedure

Blend 100g of shellfish soft tissues at high speed for 60 to 120 s until homogeneous. Sample homogenates shall be extracted within 2 h of blending. Add 300 mL acetone and homogenise for 20 s. Filter the extract through filter paper (Whatman 541) using a Buchner funnel into a 1000 mL round bottom flask. Return the solid residue to the blender cup. Add 200 mL acetone and homogenise for 20 s. Filter as before into the same flask. Filter combined extracts through cotton wool to remove any solid material that has precipitated from the extract upon contact with the cold glassware.

Remove acetone by rotary evaporation at 35 ± 2 °C. *Extracts may be covered and refrigerated at this point if overnight holding is necessary.* Add 100 mL dichloromethane to the aqueous-lipid residue and transfer the mixture to a 500 mL separating funnel. **Gently** shake the funnel and allow layers to separate. *Vigorous shaking may create toxin-containing emulsions at the interface.* Draw lower layer through anhydrous Na_2SO_4 (pre-rinsed with dichloromethane) into a 500 mL round bottom flask. *(This step is to remove any remaining water from the extract.)* Add 80 mL dichloromethane to the funnel. **Vigorously** shake the funnel and allow layers to separate. Drain the lower layer through anhydrous Na_2SO_4 into the same flask. Wash through anhydrous Na_2SO_4 with 20 mL dichloromethane and collect in the same flask. Remove dichloromethane by rotary evaporation at 35 ± 2 °C. Transfer the residue, with minimum volume dichloromethane, to a 20 mL glass vial. Remove dichloromethane by rotary evaporation or under a stream of nitrogen on a warm (40 °C) hot block in a fume hood, and then by rotary evaporation to a constant weight (± 5 mg).

Accurately weigh the residue and resuspend in Tween 60/saline such that each millilitre of final volume contains the equivalent of 20g of shellfish tissue. For a 100g sample, the final volume required is 5 mL. The weight of Tween/saline required is determined as follows: $5.00 - \text{Volume of lipid extract}$, where: $\text{Volume of lipid extract} = \text{Weight of lipid} / 0.917$. If cottonseed oil is used, the final weight = 4.59g. *[Note: The use of cotton seed oil is optional for samples that are difficult to suspend in Tween 60/saline. The density of extracted lipid is assumed to be 0.917 as per Recommended Procedures. However, changes in extraction solvent may result in different lipid extracts with different densities. This should be considered if anomalous results are encountered.]*

Mouse Bioassay for DSP/NSP toxicity

Colour code each of three mice in order to accurately keep track of elapsed times. Inoculate 1 mL of 20 g mL^{-1} intraperitoneally into each of three mice (wt: 18 to 22 g). Note and record the time of inoculation to the nearest 5 s. Observe continuously for 6 h. *[In practice this means that the mice must be monitored every few minutes so that a reasonably accurate time of*

death maybe noted.] The time of death is determined by the last gasping breath. Analysts should note the manner of mouse death. This could provide useful information if non-NSP toxins are encountered. Record the time of death and calculate death times for each mouse. Continue observation for 24 hours.

Interpretation

Two or more deaths within 6 hours	Suspect NSP ($>200 \text{ MU kg}^{-1}$). Confirm NSP using ether extraction (APHA method). Check for DSP toxins using ELISA
One or no deaths in 6 hours	NSP not detected ($<200 \text{ MU kg}^{-1}$)
Any deaths in 6 to 24 hours	Check for DSP toxins using ELISA
No deaths in further 18 hours	DSP not detected

13.6 CYCLIC IMINE/AMINE SHELLFISH TOXINS

13.6.1 AZASPIRACIDS

Azaspiracids (AZAs) are a recently identified group of shellfish toxins, presumably of dinoflagellate origin, that are responsible for an emerging type of shellfish intoxication in Europe, and named azaspiracid poisoning (AZP) (Ofuji et al., 1999a,b). Cases of AZP were first reported in the Netherlands in November 1995, caused by the ingestion of mussels from Killary Harbour, on the west coast of Ireland (McMahon and Silke, 1996; Satake et al., 1998). Acetone extracts of mussel samples from this harvest area gave strongly positive results following i.p. injection in mice and oral feeding of hepatopancreas to rats. Mice showed aberrant neurological symptoms, such as respiratory difficulties, spasms, slow progressive paralysis of the limbs, and at higher doses, death within 20 minutes, clearly differing from those of DSP toxicity.

Human symptoms caused by AZA toxins are similar to those caused by OA and DTXs, and include nausea, vomiting, severe diarrhea and stomach cramps. Neurological disorders have not been reported. *In vivo* studies with mice have shown that the target organs of AZAs are the digestive tract, liver, pancreas, thymus and spleen (Ito et al. 1998, 2000).

Azaspiracids are chemically characterized by a trispiro-assembly, a spiro-ring unique in nature fused with a 2,9 dioxabicyclo-nonane ring and a carboxylic acid (Satake et al., 1998) (see Chapter 8). In addition to the original azaspiracid structure (AZA-1), four analogues have been characterised: AZA2 (8-methylazaspiracid), AZA3 (22-demethylazaspiracid) (Ofuji et al., 1999b), AZA4 (3 hydroxy-22-demethylazaspiracid) and AZA5 (23-hydroxy-22-demethylazaspiracid) (Ofuji et al., 2001). Chemical structure of AZA4 and AZA5, suggest that they are oxidized metabolites of AZA3.

The anatomical distribution of AZAs in shellfish differs from that of DSP toxins, and the toxins can be readily disseminated from the digestive tract into other tissues. Therefore, whole shellfish tissues should be considered as potentially toxic and included in the assay sample.

13.6.1.1 Bioassay Protocols

13.6.1.1.1 Mouse bioassay

Recent findings on the tissue distribution of AZAs have led to the reconsideration of the applicability of the existing mouse bioassay procedures for polyether toxins. The mouse bioassay detailed in Method 1 (Section 13.4.2.2.1) (Yasumoto et al., 1978) may be used for the detection of AZA in shellfish, but because only the hepatopancreas is extracted in this procedure, and AZA is distributed throughout the entire shellfish soft tissues, a significant amount would not be taken into account. A bioassay using a whole shellfish tissue extract seems more appropriate. A specific mouse bioassay procedure has not yet been developed for AZA, but 100% acetone can be used for the initial extraction of fresh whole shellfish, followed by a further extraction of the tissues with methanol (twice) and liquid/liquid partitioning with diethyl-ether after evaporation of the extracting solvents (T. Yasumoto, pers. communication). The lower limits of detection, using a 24 hour observation period, is reported to be 2 to 4 μg AZA per 20g mouse (Ofuji et al., 2001). If mice are inoculated with an extract corresponding to 25 g, the detection limit would correspond to 80 to 160 μg AZA kg^{-1} shellfish tissue.

13.6.1.1.2 Rat bioassay

Azaspiracids produce diarrheic effects, and therefore (in principle) the rat bioassay outlined in Section 13.4.1.1 can be used for their detection. Unfortunately, given the absence of quantitative standards for toxicity testing, the detection limit of this oral test has not yet been determined.

13.6.2 SPIROLIDES

In 1991, routine biotoxin monitoring of bivalve molluscs for DSP toxins at aquaculture sites along the eastern shore of Nova Scotia, Canada, revealed a novel and highly potent toxic response in mice after i.p. injections of lipophilic extracts. The symptoms, which included rapid deaths and usually preceded by apparent neurological symptoms, were very different from those associated with known shellfish toxins, including those responsible for DSP or PSP intoxication. The symptoms of this novel “fast-acting toxin” in mice, after i.p. administration of contaminated shellfish extracts, vary depending on survival times and may include piloerection, splaying of the back legs, ataxia, ophthalmia, abdominal muscle spasms, hyperextensions of the back, tail whipping and arching towards the head, and immediately prior to death, front leg tremor, extension of the hind legs and loss of bladder control (D.A. Richard, unpubl. data). Extremely high doses tend to produce non-specific symptoms while survival times approaching the LD_{50} produce more specific symptomology. Elevated levels of spirolides in shellfish have not been categorically linked to any human intoxication.

Eventually, a group of cyclic imines named spirolides, consisting of a spiro-linked tricyclic ether ring system and an unusual seven-membered spiro-linked cyclic iminium moiety (see Chapter 8 for structures) were isolated from shellfish and later plankton samples (Hu et al., 1995, 1996, 2001), and the causative organism was identified as the dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Cembella et al., 2000). Spirolides belonging to groups A, B, C, and D are biologically active, whereas spirolides E and F, isolated from shellfish (Hu et al., 1996), are not. Biological inactivity of the latter compounds, which may be degradation metabolites, is presumably due the opening of the cyclic imine ring.

In toxicological studies, the oral and intraperitoneal toxicities of spirolides in mice were determined to be approximately 1 mg kg^{-1} and 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively (Richard et al., 2001) (Fig. 13.4). The pharmacological effects of spirolides were also characterized by subjecting

mice to various drugs (e.g., atropine, physostigmine, propranolol and epinephrine), followed by a challenge of a spirolide-rich extract of *A. ostensfeldii* cultures. The results suggested that spirolides affect the muscarinic acetylcholine receptors in mammalian systems, however this needs to be confirmed with specific receptor assays. Recent neuropathological studies with rodents exposed to purified spirolides (Pulido et al., 2001) have shown evidence that the hippocampus and brain stem are possible target regions in mice. At the transcriptional level, the early injury markers (EIM)-*Hsp72*, *c-fos*, and *c-jun*, and the muscarinic acetylcholine receptors were altered between control and spirolide-challenged animals.

Spirolides are not yet considered to be of concern to shellfish consumers. Therefore, there is no existing regulatory protocol and no action levels for closure of shellfish harvesting have been established. Nevertheless, shellfish producers have voluntarily withheld shellfish from the market until the unusual mouse toxicities associated with spirolides have abated.

13.6.2.1 Mouse Bioassay Protocol

As is the case for gymnodimine and certain other “fast acting toxins” of dinoflagellate origin, the recognition of characteristic symptoms of spirolide toxicity in mice first arose as a result of routine bioassays directed at other lipophilic toxins. Thus, the use of conventional

extraction and preparation protocols for DSP toxins, such as the acetone extraction procedure (Yasumoto et al., 1978) described in Section 13.4.1.2.1 are adequate for extraction of spirolides, and no specific modifications are required in the bioassay. Due to the highly acute

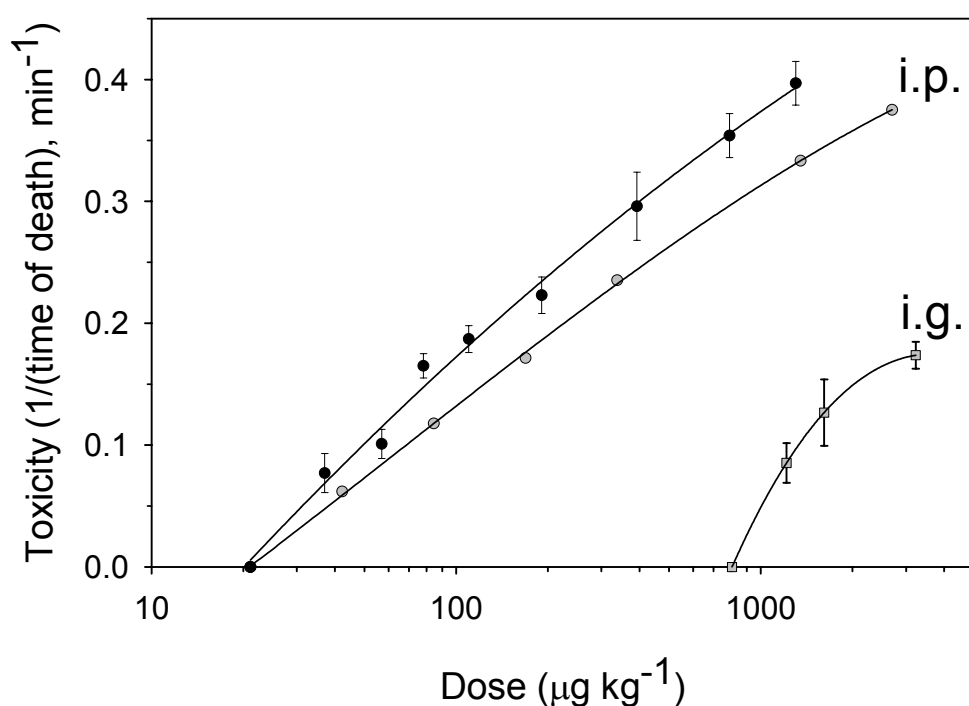


Fig.13.4 Toxicity of spirolides in mice through intraperitoneal (i.p.) and oral (i.g.) dosing. The curves are logistic dose-response curve fits (SigmaPlot). The i.p. data points are means of duplicate tests, whereas those for the i.g. tests are means of 6-8 replicate tests, with standard deviations shown as error bars. (adapted from Richard et al., 2001 and D.A. Richard, M.A. Quilliam and A.D. Cembella, unpublished data).

toxicity of spirolides administered intraperitoneally into mice and the specific symptomology, the mouse bioassay is an effective method of monitoring spirolide toxicity in shellfish. The survival time of i.p. injected mice is typically 3 to 20 minutes and is often, but not always, preceded by neurological symptoms, including convulsions. If a mouse survives past 20 minutes, even while demonstrating symptoms, it will normally recover fully and quickly. When extracts produce symptoms typical for spirolides, and other lipophilic toxins are not confirmed by analytical methods such as LC-MS, to be present, interpretation of the bioassay is rather straightforward. When using the mouse bioassay, the synergistic or antagonistic effects due to the presence of other co-extracted lipophilic toxins in shellfish matrices remains undetermined. At the very least, the presence of spirolides may mask the presence, and in turn the interpretation of mouse bioassay results for DSP toxicity, for which long observation periods are required and extended death times are common.

13.6.3 GYMNODIMINE

In early 1994, intraperitoneal toxicity in mice was detected during the analysis of shellfish extracts prepared by the New Zealand Health Department using the acetone extraction method (Yasumoto et al., 1978) followed by dichloromethane partition (Hannah et al., 1995). Dredge oysters (*Tiostrea chilensis*), in particular, were found to be highly toxic, but further analysis did not demonstrate any detectable level of DSP or NSP toxins. Furthermore, the symptoms and dose response in mice did not match other known marine toxins. Undiluted shellfish extracts fed to rats and mice elicited no signs of oral toxicity (MacKenzie et al., 1996).

Isolation and purification of the novel toxin gymnodimine, a pentacyclic compound incorporating a C24 carboxylic acid and a fused azine (see Chapter 8), was accomplished with reference to a bioassay-guided fractionation of toxic shellfish (MacKenzie, 1994; Seki et al., 1995, 1996; MacKenzie et al., 1996). Gymnodimine is stable in acidic solutions but labile in basic solutions (Miles et al., 1999). The mode of action of the “fast acting toxicity” of gymnodimine has not been clearly elucidated, but symptoms are strongly characteristic of neurotoxicity. It should be noted that gymnodimine shares a high degree of structural homology with spirolides and pinnatoxin (see Chapter 8), thus cleavage of the nitrogenous ring will lead to deactivation (Stewart et al., 1997). In early studies, intraperitoneal mouse lethality (ddY strain) for gymnodimine was found to be $450 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Seki et al., 1995). Administration of strongly toxic extracts yielded rapid and non-specific mortality in mice. Death times between 5 and 15 minutes produced neurological symptoms such as curled tail, jumping and paralysis (Seki et al., 1996). Yet more recent studies on gymnodimine indicate higher potency than originally believed, with i.p. mouse toxicity values of $96 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Miles et al., 1999). Based on preliminary work indicating low oral potency in rodents (MacKenzie et al., 1996), and after a one-year closure of areas affected by gymnodimine, the New Zealand Marine Biotxin Management Board made the decision that in cases where only gymnodimine was detected further shellfish area closures were not required. While there has been no indication that gymnodimine has any effects on humans, the New Zealand Marine Biotxin Technical Committee, has decided that more formal Organisation for Economic Co-operation and Development (Paris) toxicity studies should be conducted, and these are presently underway (Fall 2001).

13.6.3.1 Mouse Bioassay Protocol

Since gymnodimine is readily extracted by the Yasumoto protocol for DSP toxins (Section 13.4.2.2.1), it is presently considered to be an undesirable artifact of this DSP toxin extraction procedure. No specific mouse bioassay procedure has been developed for the monitoring of this compound in shellfish tissues. During the original investigative phase, it was determined

that the ether extraction protocol had the effect of reducing the toxicity of shellfish extracts due to gymnodimine by greater than 90% (MacKenzie et al., 1996). Confirmation of gymnodimine as the cause of a positive mouse bioassay is most conveniently done using LC-MS methods (Stirling et al., 2002; see Chapter 8). Partitioning an acidified acetone extract between water and ethyl acetate (in place of dichloromethane) can also reduce the amount of gymnodimine detected in the mouse bioassay (T. Yasumoto, pers. comm.).

CONCLUSIONS

There is still a paucity of simple, rapid, robust and sensitive procedures that can be used with reliance by regulatory laboratories for public health control of seafood toxicity caused by phycotoxins. This is particularly true for the toxins associated with PSP, DSP, NSP and for ciguatera poisoning. In the near future, certain *in vitro* assays (see Chapter 12) may be applied as routine screening tools for regulatory purposes, but thus far, in spite of increasing ethical considerations, most countries rely primarily or exclusively upon mammalian bioassays. In some countries, regulations against the use of experimental animals may complicate effective phycotoxin monitoring, since alternative toxicological procedures are not readily available. In any case, for the foreseeable future it is likely that both regulatory regimes and toxicological researchers will remain dependent upon effective whole animal bioassays for screening of acute toxicity effects and for studies on the effects of chronic toxin exposure.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Phil Busby, Takeshi Yasumoto, Ana Martinez, Aurea Míguez, Emiliano Cacho, Penny Truman, Nancy Lewis and Michael Quilliam for critical comments and other contributions to the methods and procedures outlined in this chapter.

REFERENCES

- Association of Official Analytical Chemists (1990). Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action. In: Hellrich, K. (ed.), *Official Methods of Analysis*. 15th Edition, sec 959.08. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, pp. 881-882.
- American Public Health Association (1985). Method for *Ptychodiscus brevis* toxins. *Laboratory Procedures for the Examination of Seawater and Shellfish*, 5th Ed. American Public Health Association, Inc., Washington, D.C., pp. 64-80.
- Aune, T., Yndestad, M. (1993). Diarrhetic shellfish poisoning. In: Falconer, I. (ed), *Algal Toxins In Seafood And Drinking Water*. Academic Press, London, pp. 87-104.
- Aune, T., Sorby, R., Yasumoto, T., Ramstad, H., Landsverk, T. (2001). Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicon* 40: 77-82.
- Cacho, E. (1993). Zinc, cadmio y cobre en ostras de distintas procedencias. Interferencias en la determinación de PSP por bioensayo. In: Mariño, J., Maneiro, J. (eds), *Tercera Aula Ibirica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas Marinas*. Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, Spain, pp. 79-82.
- Cembella, A.D., N.I. Lewis and M.A. Quilliam. 2000. The marine dinoflagellate *Alexandrium ostentfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. *Phycologia* 39: 67-74.
- Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Poletti, R., Viviani, R. (2000). A new analogue of yessotoxin, carboxyessotoxin, isolated from Adriatic Sea mussels. *Eur. J. Org. Chem.* 2000: 291-295.

- Croci, L., Toti, L., De Medici, D., Cozzi, L. (1994). Diarrhetic shellfish poison in mussels: Comparison of methods of detection and determination of the effectiveness of depuration. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 337-342.
- Daiguji, M., Satake, M., Ramstadt, H., Aune, T., Yasumoto, T. (1998). Structure and fluorometric HPLC determination of 1-desulfoyessotoxin, a new yessotoxin analog, isolated from mussels from Norway. *Nat. Tox.* 6: 235-239.
- De la Rosa, L.A., Alfonso, A., Vilariño, N., Vieytes, M.R., Botana, L.M. (2001). Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin. *Biochem. Pharmacol.* 61: 827-833.
- Doucette, T.A., Strain, S.M., Allen, G.V., Ryan, C.L., Tasker, R.A.R. (2000). Comparative behavioural toxicity of domoic acid and kainic acid in neonatal rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 22: 863-869.
- Fernández, M. L., Míguez, A., Cacho, E., Martínez, A. (1996). Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. *Toxicon* 34: 381-387.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Takagi, K., Uda, N., Wakamatsu, K., Yamada, K., Murata, M., Yasumoto, T., Sugimura, T. (1988). Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1 is a potent tumor promoter on mouse skin. *Jpn. J. Cancer Res.* 79: 1089-1093.
- Hall, S., Strichartz, G., Moczydlowski, E., Ravindran, A., Reichardt, P.B. (1990). The saxitoxins. Sources, chemistry, and pharmacology. In: Hall, S., Strichartz, G. (eds), *Marine Toxins. Origin, Structure, and Molecular Pharmacology*, ACS Symposium Series 418. American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 29-65.
- Hamano, Y., Kinoshita, Y., Yasumoto, T. (1986). Enteropathogenicity of diarrhetic shellfish toxins in intestinal models. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 27: 375-379.
- Hannah, D.J., Till, D.G., Deverall, T., Jones, P.D., Frémy, J-M. (1995). Extraction of lipid-soluble marine biotoxins. *J. AOAC Int.* 78: 480-483.
- Hu, T., Curtis, J. M., Oshima, Y., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Watson-Wright, W.M., Wright, J.L.C. (1995). Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 2159-2161.
- Hu, T., Curtis, J. M., Walter, J. A., Wright, J. L. C. (1996). Characterization of biologically inactive spirolides E and F: identification of the spirolide pharmacophore. *Tet. Lett.* 37: 7671-74.
- Hu, T., Burton, I.W., Cembella, A.D., Curtis, J.M., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, J.L.C. (2001). Characterization of spirolides A, C, and 13-desmethyl-C, new marine toxins isolated from toxic plankton and contaminated shellfish. *J. Nat. Prod.* 64: 308-312.
- Hurst, J.W., Selvin, R., Sullivan, J.J., Yentsch, C.M., Guillard, R.R.L. (1985). Intercomparison of various assay methods for the detection of shellfish toxins. In: Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G. (eds), *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier-North Holland, New York, pp. 427-432.
- Irwin, N. (1970) In: *Recommended Procedures for the Examination of Seawater and Shellfish*, 4th Ed. American Public Health Association, Washington, D.C., pp. 61-65.
- Ishige, M., Satoh, N., Yasumoto, T. (1988). Pathological studies on the mice administered with the causative agent of diarrhetic shellfish poisoning (okadaic acid and pectenotoxin-2. *Report from the Hokkaido Institute of Health* 38, pp. 15-19. (in Japanese with an English abstract)
- Ito E., Terao, K., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T. (1998). Acute pathological changes in mice caused by crude extracts of novel toxins isolated from Irish mussels. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (eds), *Harmful Algae*. IOC (UNESCO) and Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, Spain, pp. 588-589.

- Ito E., Satake M., Ofuji K., Kurita N., McMahon T., James K.J., Yasumoto T. (2000). Multiple organ damage caused by new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. *Toxicon* 38: 917-930.
- Jung, J.H., Sim, C.J., Lee, C.O. (1995). Cytotoxic compounds from a two-sponge association. *J. Nat. Prod.* 58: 1722-1726.
- Kat, M. (1983). Diarrhetic mussel poisoning in the Netherlands related to the dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Antonie V. Leeuwenhoek* 49, p. 417.
- Lawrence, J.F., Chadha, R.K., Ratnayake, W.M.N., Truelove, J.F. (1994) An incident of elevated levels of unsaturated free fatty acids in mussels from Nova Scotia and their toxic effects in mice after intraperitoneal injection. *Nat. Tox.* 2: 318-321.
- Lee, J.S., Yanagi, T., Kenma, R., Yasumoto, T. (1987). Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.* 51: 877-881.
- Lewis, R.J. (1995). Detection of ciguatoxins and related benthic dinoflagellate toxins: *in vivo* and *in vitro* methods. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (eds), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides No. 33, IOC-UNESCO, Paris, pp. 135-161.
- Luckas, B. (2000). Phycotoxins in the marine environment: control of marine organisms for contamination with algal toxins. *Int. J. Environ. Pollut.* 13: 148-172.
- Marcaillou-Le Baut, C., Lucas, D., Le Dean, L. (1985). *Dinophysis acuminata* toxins: status of toxicity bioassays in France. In: Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G. (eds), *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier-North Holland, New York, pp. 427-432.
- Marcaillou-Le Baut, C., Masselin, P. (1990). Recent data on diarrhetic shellfish poisoning in France. In: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L., Anderson, D.M. (eds), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 485-488.
- McCulloch, A., Boyd, R., De Freitas, A., Foxall, R., Jamieson, W., Laycock, M., Quilliam, M., Wright, J. (1989). Zinc from oyster tissue as causative factor in mouse deaths in official bioassay for paralytic shellfish poison. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72: 384-386.
- McFarren, E.F. (1959). Report on collaborative studies of the bioassay for paralytic shellfish poison. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 42: 263-271.
- McMahon, T., Silke, J. (1996). Winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae News* 14: p. 2.
- MacKenzie, L. (1994) More blooming problems – toxic algae and shellfish biotoxins in the South Island (January-May 1994). *Seafood New Zealand*, June 1994, pp. 47-52.
- MacKenzie, L., Haywood, A., Adamson, J., Truman, P., Till, D., Seki, T., Satake, M., Yasumoto, T. (1996). Gymnodimine contamination of shellfish in New Zealand. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (eds), *Harmful And Toxic Algal Blooms*. IOC (UNESCO), Paris, pp. 93-96.
- Miguez, A., Fernández, M.L., Cacho, E., Martinez, A. (1998). Mouse survival time as a DSP toxicity criterion. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (eds), *Harmful Microalgae*. Xunta de Galicia and IOC (UNESCO), Santiago de Compostela, Spain, pp. 239-240.
- Miles, C.O., Hawkes, A.D., MacKenzie, A.L., Munday, R., Towers, N.R., Prinsep, M.R. (1999). Chemistry and toxicity of gymnodimine. In: *Marine Biotoxin Science Workshop No. 12*, New Zealand Ministry of Agriculture and Forestry, pp. 94-98
- Nagashima, Y., Noguchi, T., Tanaka, M., Hashimoto, K. (1991). Thermal degradation of paralytic shellfish poison. *J. Food Sci.* 56:1572-1575.
- Ofuji, K., Satake, M., Oshima, Y., McMahon, T., James, K.J., Yasumoto, T. (1999a). A sensitive and specific determination method for azaspiracids, principal toxins of azaspiracid poisoning, by liquid chromatography mass spectrometry. *Nat. Tox.* 7: 247-250.

- Ofuji, K., Satake, M., McMahon, T., Silke, J., James, K.J., Naoki, H., Oshima, Y., Yasumoto, T. (1999b). Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Nat. Tox.* 7: 99-102.
- Ofuji, K., Satake, M., McMahon, T., James, K.J., Naoki, H., Oshima, Y., Yasumoto, T. (2001). Structures of azaspiracid analogs, azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of azaspiracid poisoning in Europe. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 740-742.
- Ojino, H., Kumagai, M., Yasumoto, T. (1997). Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Nat. Tox.* 5: 255-259.
- Oshima, Y. (1995). Post-column derivatization HPLC methods for paralytic shellfish poisons. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (eds), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and guides No. 33. IOC-UNESCO, Paris, pp.81-94.
- Pulido, O., Richard, D., Clausen, J., Murphy, M., Smyth, P., Mueller, R., MacKinnon, S., Quilliam, M., Gill, S. (2001). Toxicological neuropathy from domoic acid to spirolides: the Health Canada experience. In: Proc. of the Seventh Canadian Workshop on Harmful Marine Algae, May 23-25, Nanaimo, Canada, in press.
- Quilliam, M., Sim, P.G., McCulloch, A.W., McInnes, A.G. (1989). High-performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 36: 139-154.
- Quilliam, M., Eaglesham, G., Hallegraeff, G., Quaine, J., Richard, D., Nunez, P. (2000). Detection and identification of toxins associated with a shellfish poisoning incident in New South Wales, Australia. *Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms*, 7-11 Feb. 2000, Hobart, Tasmania, Australia, (Abstract), p. 48.
- Richard, D., Arsenault, E., Cembella, A., Quilliam, M. (2001). Investigations into the toxicology and pharmacology of spirolides, a novel group of shellfish toxins. In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (eds), *Proceedings of the Ninth International Conference on Harmful Microalgae*. IOC (UNESCO), Paris, pp. 383-386.
- Ross, M.R., Siger, A., Abbott, B.C. (1985). The house fly: an acceptable subject for paralytic shellfish toxin bioassay. In: Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G. (eds), *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier-North Holland, New York, pp. 433-438.
- Sasaki, K., Wright, J.L.C., Yasumoto, T. (1998). The identification and characterization of pectenotoxins (PTX)4 and PTX7 as spiroketal stereoisomers of two previously unreported pectenotoxins. *J. Org. Chem.* 63: 2475-2480.
- Satake, M., Terasawa, K., Kadowaki, Y., Yasumoto, T. (1996). Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogs from toxic scallop. *Tet. Lett.* 37: 5955-5958.
- Satake, M., Tubaro, A., Lee, J.-S., Yasumoto, T. (1997). Two new analogs of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea. *Nat. Tox.* 5: 107-110.
- Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T. (1998). Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.* 120:38 9967-9968.
- Seki, T., Satake, M., MacKenzie, L., Kaspar, H.F., Yasumoto, T. (1995). Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate *Gymnodinium* sp. *Tet. Lett.* 36: 7093-7096.
- Seki, T., Satake, M., MacKenzie, L., Kaspar, H.F., Yasumoto, T. (1996). Gymnodimine, a novel toxic imine isolated from the Foveaux Strait oysters and *Gymnodinium* sp. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (eds), *Harmful And Toxic Algal Blooms*. IOC (UNESCO), Paris, pp. 495-498.
- Shantz, E.J., McFarren, E.F., Schaffer, M.L., Lewie, K.H. (1958). Purified poison for bioassay standardization. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 41: 160-168.
- Sommer, H., Meyer, K.F. (1937). Paralytic shellfish poisoning. *Arch. Pathol.* 24: 560-598.
- Stewart, M., Blunt, J.W., Munro, M.H.G., Robinson, W.T., Hannah, D.J. (1997). The absolute stereochemistry of the New Zealand shellfish toxin gymnodimine. *Tet. Lett.* 38: 4889-4890.

- Stirling, D.J., LeBlanc, Y., Quilliam, M.A. (2002). Analytical methods for yessotoxin and gymnodimine. *J. AOAC Int.*, in press.
- Takagi, T., Hayashi, K., Itabashi, Y. (1984). Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse assay of diarrhetic shellfish toxin by intraperitoneal injection. *Nippon Suisan Gakkaishi* 50: 1413-1418.
- Tasker, R.A.R., Connell, B.J., Strain, S.M. (1990). Pharmacology of systemically administered domoic acid in mice. *Can. J. Phys. Pharma.* 69: 378-382.
- Terao K., Ito E., Yanagi T., Yasumoto, T. (1986). Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1. *Toxicon* 24: 1141-1151.
- Terao, K., Ito, E., Ohkusu, M., Yasumoto, T. (1993). A comparative study of the effects of DSP toxins on mice and rats. In: Smayda, T. J., Shimizu, Y. (eds), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 581-586.
- Terao, K., Ito, E., Oarada, M., Murata, M., Yasumoto, T. (1990). Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon* 28: 1095-1104.
- Todd, E.C.D. (1990). Amnesic shellfish poisoning- a new seafood toxin syndrome. In: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L., Anderson, D.M. (eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, Amsterdam, pp. 504-508.
- Vale, P., Sampayo, A. (1996). DTX-2 in Portuguese bivalves. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC (UNESCO), Paris, pp. 539-542.
- Vieytes, J.M., Leira, F., Botana, L.M., Vieytes, M.R. (1996). Determination of DSP toxins: comparative study of HPLC and bioassay to reduce the observation time of the mouse bioassay. *Arch. Toxicol.* 70: 440-443.
- Vernoux, J.P., Le Baut, C., Masselin, P., Marais, C., Baron, B., Choumiloff, R., Proniewski, F., Nizard, G., Bohec, M. (1993). The use of *Daphnia magna* for the detection of okadaic acid in mussel extracts. *Food Addit. Contam.* 10: 603-608.
- Wright, J.L.C., Boyd, R.K., De Freitas, A.S.W., Falk, M., Foxall, R.A., Jamieson, W.D., Laycock, M.V., McCulloch, A.W., McInnes, A.G., Odense, P., Pathak, V., Quilliam, M.A., Ragan, M., Sim, P.G., Thibault, P., Walter, J.A., Gilgan, M., Richard, D.J.A., Dewar, D. (1989). Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern P.E.I. *Can. J. Chem.* 67: 481-490.
- Yasumoto, T. (2000). Historic considerations regarding seafood safety. In: Botana, L.M. (ed), *Seafood and Freshwater Toxins*. Marcel Dekker, New York, pp. 1-17.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M. (1978). Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 44: 1249-1255.
- Yasumoto, T., Murata, M., Lee, J.S., Torigoe, K. (1989). Polyether toxins produced by dinoflagellates. In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. (eds), *Mycotoxins and Phycotoxins*. Elsevier, Amsterdam, pp. 375-382.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Matsumoto, K., Clardy, J. (1984). Diarrhetic shellfish poisoning. In: Ragelis, E.P. (ed), *Seafood Toxins, ACS Symposium Series* 262. American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 207-214.

RESUMEN

Hasta la fecha, la mayor parte de los programas de control de toxinas marinas en los alimentos han estado basados en ensayos *in vivo*. El principio general de estos ensayos se basa en la administración al animal de la muestra a analizar o de un extracto de la misma, ya sea por vía oral o, lo que es más usual, mediante inyección intraperitoneal, seguida de la observación de los síntomas y/o de la determinación del tiempo de supervivencia, parámetro que se utiliza frecuentemente para la cuantificación a través de curvas dosis-respuesta previamente establecidas.

Los bioensayos por administración oral simulan el modo de intoxicación en humanos y en la mayoría de ellos no se realiza una extracción química de las toxinas, evitándose así posibles pérdidas asociadas a este proceso. En la práctica, la aplicación de este tipo de ensayos con fines de control sanitario conlleva un alto grado de inexactitud derivado de la dificultad para establecer una relación cuantitativa entre la cantidad de toxina ingerida por el animal y la respuesta observada.

En la administración de la muestra o toxina por vía intraperitoneal, funciones asociadas con el tracto gastrointestinal como absorción, distribución y metabolización, que podrían tener influencia en un aumento o disminución de la toxicidad, no son tenidas en cuenta (Sullivan *et al.*, 1993). Sin embargo, los bioensayos por inyección intraperitoneal, como herramientas para cuantificar la toxicidad, pueden ser realizados en condiciones más controladas y la relación dosis-respuesta se establece de forma más exacta y precisa. Los extractos serán acuosos u orgánicos dependiendo de las propiedades de solubilidad de las toxinas, y pueden ser purificado en mayor o menor grado a través de diferentes procesos de partición líquido/líquido con distintos solventes, que permitan separar las diferentes sustancias presentes en la muestra en función de su polaridad.

Tras la administración del extracto tóxico al animal, se procede a la observación y evaluación de la sintomatología característica de los diferentes síndromes tóxicos y a la determinación del tiempo de supervivencia, parámetro que en la mayoría de los bioensayos se utiliza para la valoración de la toxicidad. Esta valoración ha de ir precedida de una calibración previa de la respuesta de los animales con las toxinas a determinar. En la práctica se calibra con una sola de las toxinas del grupo, obteniéndose una curva dosis respuesta, y se expresa posteriormente la toxicidad en equivalentes de esta toxina.

Para la obtención de resultados de confianza y reproducibles, es necesario mantener una colonia estandarizada de ratones en condiciones ambientales controladas y realizar una calibración frecuente de la colonia con la/s toxina/s a medir. Los factores ambientales que merecen especial atención son la temperatura, la humedad, los ciclos de luz/oscuridad y los ciclos de renovación del aire. Existen otros parámetros que pueden afectar la respuesta o la supervivencia de los animales, siendo muy importantes la cepa de ratones, la edad, el peso, el sexo y el estado general. Estos parámetros adquieren especial importancia cuando la toxicidad está próxima a los límites establecidos en las regulaciones sanitarias, de tal forma que a partir de pequeñas variaciones en los resultados se podría derivar la aceptación o el rechazo de una mercancía destinada al consumo humano. El grado de confianza y la precisión del ensayo están directamente relacionados con la calidad y el estado de los animales utilizados. En el caso de que los laboratorios no dispongan de animalarios, se pueden utilizar ratones procedentes de proveedores o empresas cualificadas y certificadas para su cría y suministro. Se deberá realizar una planificación adecuada de las peticiones de animales de tal forma que se respete el periodo de acondicionamiento necesario, de manera que los animales se encuentren en condiciones óptimas de estado general y de peso para la realización del ensayo.

Los bioensayos en ratón son poco selectivos, de baja especificidad y sensibilidad, pueden producir falsos positivos debido a interferencias de las matrices biológicas y la variabilidad entre laboratorios es alta (alrededor de un 20%). Sin embargo, la baja especificidad es de gran utilidad desde el punto de vista de la estimación del riesgo para la salud pública, puesto que permite la detección de nuevas toxinas o congéneres, proporcionando de esta forma un alto grado de protección al consumidor.

Bioensayos para la detección de toxinas DSP

En el caso de las toxinas históricamente incluidas en el grupo DSP, no ha existido un protocolo de bioensayo acordado y reconocido internacionalmente y que haya sido sometido a un proceso formal de estandarización y validación. Si bien es cierto que la mayor parte de los países que realizan el control de estas toxinas en los moluscos han venido utilizando ensayos *in vivo*, existen diferencias en cuanto al animal usado (rata o ratón albino), en cuanto al modo de administración de la toxinas (ingestión oral en el caso de la rata, o inyección intraperitoneal en el caso del ratón) y en cuanto a la naturaleza y proporción de los solventes utilizados para la extracción de las toxinas. Esto se ha traducido en una diferente especificidad, selectividad y recuperabilidad de los bioensayos y por tanto en una falta de equivalencia de los mismos, de tal manera que algunos protocolos pueden detectar todo el

rango de sustancias lipofílicas bioactivas potencialmente presentes en los mariscos contaminados, mientras que la mayor especificidad de otros protocolos limita el espectro de toxinas detectables por los mismos. Han existido igualmente discrepancias en cuanto a los criterios de positividad del ensayo.

Los principales bioensayos utilizados para la detección de toxinas DSP son los siguientes:

El bioensayo de la rata

En el bioensayo de la rata (Kat *et al.*, 1983), ratas Wistar (*Rattus norvegicus* 100-120g) son alimentadas con el hepatopáncreas de los moluscos a analizar. Al día siguiente se valora la consistencia de las heces: normal (0 ó -), normal-blanda (1 ó +), blanda (2 ó ++), blanda-diarreica (3 ó ++++) o diarreica (4 ó +++++). Una consistencia distinta a la normal (> 0) es interpretada como presencia de toxinas DSP en la muestra y se traduce en la calificación de dicho alimento como “no apto para el consumo”.

El bioensayo de la rata es un ensayo de administración oral, y por tanto simula el modo de intoxicación en humanos. Los síntomas que muestra la rata son similares a los del síndrome diarreico en humanos. Por otra parte no se realiza una extracción química de las toxinas de tal forma que se evitan posibles pérdidas de toxinas asociadas a este proceso. Con este procedimiento únicamente las toxinas DSP que producen síntomas genuinamente diarreicos, fundamentalmente el AO y derivados y probablemente algunas pectenotoxinas son detectadas. El ensayo es muy sensible para la detección del AO y análogos. Las yesotoxinas no son detectadas por este ensayo.

El ensayo es cualitativo y poco específico, de tal forma que agentes diarreicos diferentes al AO y derivados pueden producir resultados positivos e influir en el diagnóstico. La precisión es baja debido a la amplia variación individual en la sensibilidad y sintomatología de las ratas.

En los últimos años, el bioensayo de la rata ha recobrado valor desde el punto de vista del control sanitario, debido a la aparición de un nuevo grupo de ficotoxinas, el azaspirácido y análogos, responsables del síndrome tóxico “AZP” (envenenamiento por azaspirácido). La intoxicación cursa con sintomatología diarreica, de tal forma que la presencia de estas toxinas en los moluscos es detectable mediante este bioensayo.

Bioensayo de Yasumoto (1978)

El protocolo del bioensayo en ratón para determinación de toxinas DSP, basado en el ensayo propuesto por Yasumoto en 1978 (Yasumoto *et al.*, 1978), ha sido utilizado en numerosos países para el control sanitario de DSP. En el procedimiento original, las toxinas son extraídas del hepatopáncreas de los moluscos con acetona. Tras evaporación del solvente y resuspensión del residuo en solución salina estéril, el extracto final es inyectado intraperitonealmente en cada uno de tres ratones albinos (20g), procediéndose a la observación de los mismos durante un tiempo entre 24 y 48 horas, para realizar el cálculo de la toxicidad en lo que se denomina “unidades ratón” (UR). Los síntomas mostrados por el ratón son postración y debilidad general. En el caso de este grupo de toxinas, se define la unidad ratón como la cantidad mínima de toxina administrada por inyección intraperitoneal que se necesita para producir la muerte de un ratón de 20 g en 24 horas. Según los estudios de Yasumoto, una unidad ratón corresponde a 4 microgramos de ácido okadaico y 3.2 microgramos de DTX1. En el caso de tiempos de supervivencia inferiores a 24 horas, la determinación de la toxicidad en unidades ratón requiere sucesivas diluciones del extracto hasta encontrar aquella que produce la muerte de los ratones en 24 horas. El límite que se estableció originalmente en Japón fue de 5 UR/100g carne. Dado que este procedimiento es largo y laborioso, en la práctica se suele utilizar el tiempo de supervivencia del ratón para la evaluación de la toxicidad. El bioensayo en ratón de Yasumoto (1978) detecta AO y derivados, Pectenotoxinas y Yesotoxinas, y además otras posibles toxinas liposolubles que podrían estar presentes en los moluscos como son: espirólidos, gimnodimina, azaspirácido, brevetoxinas y ciguatoxinas. La sintomatología del ratón es muy diferente dependiendo de las sustancias presentes, pero no siempre es posible discernir qué tipo de toxinas o sustancias han producido la muerte del ratón. Aunque por su carácter poco selectivo, el ensayo es susceptible de interferencias (toxinas DSP, ASP, sales, ácidos grasos, etc.), este ensayo ha demostrado gran eficacia en la protección de la salud pública a lo largo de muchos años de aplicación en numerosos países.

Bioensayo en ratón de Yasumoto (1984)

Con el propósito de eliminar las interferencias producidas por las toxinas DSP en el bioensayo propuesto en 1978, se desarrolló un protocolo alternativo (Yasumoto *et al.*, 1984). Tras la evaporación de la acetona del extracto bruto, se procede a una redisolución del extracto lípido-acuoso en éter dietílico, posteriores lavados de la fase etérea con pequeños

volúmenes de agua, evaporación del éter y de nuevo resuspensión del extracto en solución salina estéril para posterior inoculación en los ratones. Con este procedimiento no sólo las toxinas PSP sino también otras interferencias de tipo polar debidas a toxinas ASP o sales, que podrían estar presentes en las muestras, son eliminadas en la fase acuosa. Aunque los lavados del extracto etéreo con agua representan una mejora en cuanto a la eliminación de interferencias, toxinas lipídicas de polaridad superior al ácido okadaico, como es el caso de las yesotoxinas son parcialmente eliminadas en la partición con agua, y por tanto, de estar presentes en las muestras, podrían ser subestimadas. Este inconveniente puede ser obviado substituyendo el éter dietílico por diclorometano, solvente que solubiliza no solo al AO y análogos y las PTXs sino también las YTXs.

Una ventaja adicional de los protocolos que incluyen particiones líquido/líquido con agua es que variando adecuadamente las cantidades de los solventes permiten su aplicación a la determinación de DSP sobre el cuerpo entero del molusco (muy útil en el caso de moluscos de muy pequeño tamaño) o sobre productos eviscerados. El realizar la detección de toxinas DSP a partir del cuerpo entero de los moluscos produce resultados de mayor exactitud y es más susceptible de estandarización, pero la mayor laboriosidad del proceso así como la elevada toxicidad del diclorometano ha limitado su aplicación en rutina en programas de control que requieran el procesado y análisis de un número muy elevado de muestras. Sin embargo, con el reciente descubrimiento de la ocurrencia en moluscos del azaspirácido y análogos, responsables del AZP, y la constatación de que estas toxinas no se concentran en las glándulas digestivas de los moluscos, sino que se distribuyen por todos los tejidos del molusco, se está considerando la introducción en rutina del análisis del cuerpo entero para de esta forma posibilitar el control sanitario de AZP, a la espera de que se desarrollen ensayos más específicos.

Bioensayo en ratón para eliminación de ácido grasos

Existe otra variación del método original de Yasumoto que tras la evaporación de la acetona, introduce una redisolución del extracto en metanol al 80% y lavados de la fase metanólica con hexano (Le Baut *et al.*, 1990). Tras descartar las fases de hexano, el extracto metanólico es evaporado y resuspendido en solución salina estéril para su posterior inoculación. Si bien con este procedimiento se eliminan las interferencias de ácidos grasos, las toxinas menos polares del grupo del AO, como son los acil-derivados (DTX3), son eliminadas en los lavados con hexano y por tanto no pueden ser detectadas.

Tiempo de supervivencia como criterio de positividad

El protocolo original del bioensayo en ratón para la detección de toxinas diarreicas se diseñó para que la determinación y expresión de la toxicidad se efectuara en unidades ratón (UR) estableciéndose un límite de 5 UR/ 100 g carne (Yasumoto et al. 1984). La unidad ratón se definió como la cantidad mínima de toxina que administrada intraperitonealmente produce la muerte de un ratón de 20 g en 24 horas, esto es, 4 microgramos en el caso del ácido okadaico y 3.2 microgramos en el caso de la DTX1. En el caso de tiempos de supervivencia inferiores a 24 horas, la determinación de la toxicidad en unidades ratón requiere sucesivas diluciones del extracto hasta encontrar aquella que produce la muerte de los ratones en 24 horas. Dado que este procedimiento es largo y laborioso, en rutina se utiliza el tiempo de supervivencia del ratón para la valoración de la toxicidad, de tal forma que en la práctica habitual de los laboratorios de control la constatación de la muerte de “dos de tres ratones inyectados antes de 24 horas” se considera como resultado positivo, y no se realizan posteriores diluciones del extracto para el cálculo de las unidades ratón. Si bien durante algunos años se produjeron discrepancias en el criterio de positividad derivadas del hecho de que, ciertos países redujeron el tiempo de supervivencia considerado como resultado positivo de 24 a 5 horas (la base para esta reducción, y sus repercusiones se discuten en profundidad a lo largo del trabajo), en la actualidad, se ha uniformizado dicho criterio a través de la Decisión 2002/225/CE que establece como criterio de positividad la muerte de dos de tres ratones antes de 24 horas.

La revisión efectuada sobre los diferentes protocolos de bioensayo en ratón para la determinación de DSP muestra que no son equivalentes. Entre todos ellos, el bioensayo desarrollado inicialmente por Yasumoto *et al.* (1978) para la detección de toxinas DSP y sujeto posteriormente a modificaciones para aumentar su selectividad (Yasumoto *et al.*, 1984) ha sido ampliamente utilizado y ha demostrado su valor en la protección de la salud pública.

En los últimos años, la presión para reducir o eliminar el uso de animales de experimentación junto con el desarrollo de métodos alternativos tales como ensayos *in vitro* o métodos químicos ha dado lugar a modificaciones en la legislación de manera que en la actualidad, y como se discutirá en el capítulo siguiente, se ha abierto la posibilidad de utilizar métodos de determinación de toxinas alternativos a los bioensayos con animales siempre que sean sometidos a procesos previos de validación y que se demuestre que proporcionan un nivel de protección equivalente al proporcionado por los bioensayos en ratón. Mientras tanto,

al igual que en el caso de las toxinas del grupo PSP y NSP, el bioensayo en ratón permanece como un elemento fundamental en los programas de control sanitario de las toxinas DSP.

CONCLUSIONES

Hasta muy recientemente, los bioensayos en ratón han sido los únicos métodos reconocidos para la determinación de toxinas PSP, DSP y NSP con fines de control sanitario y han demostrado su eficacia en la protección de la salud pública.

La baja especificidad de los bioensayos ha sido de gran utilidad desde el punto de vista de la estimación del riesgo, puesto que detectan un amplio rango de toxinas y permiten la detección de nuevas toxinas o congéneres, proporcionando de esta forma un alto grado de protección al consumidor.

Los diferentes protocolos de bioensayo en ratón para la determinación de DSP no son equivalentes. Entre todos ellos, el bioensayo desarrollado inicialmente por Yasumoto *et al.* (1978) para la detección de toxinas DSP y sujeto posteriormente a modificaciones para aumentar su selectividad (Yasumoto *et al.*, 1984) ha sido ampliamente utilizado y ha demostrado su valor en la protección de la salud pública.

En los últimos años, la presión para reducir o eliminar el uso de animales de experimentación junto con el desarrollo de métodos alternativos ha dado lugar a modificaciones en la legislación de manera que se ha abierto la posibilidad de utilizar métodos alternativos a los bioensayos con animales siempre que sean sometidos a procesos previos de validación y que se demuestre que proporcionan un nivel de protección equivalente al proporcionado por los bioensayos.

Es previsible que en el futuro próximo los bioensayos dejen de ser utilizados como herramientas rutinarias de análisis con fines de control sanitario, si bien es importante que permanezcan como herramientas de investigación para la detección de nuevos compuestos o nuevos grupos de toxinas.

Mientras tanto, el bioensayo en ratón permanece como un elemento fundamental en los programas de control sanitario por lo que es importante seguir realizando esfuerzos orientados a la validación e intercalibración de los bioensayos utilizados en la actualidad para el control de toxinas DSP.

CAPITULO IV

GESTIÓN Y MITIGACIÓN DE LOS EPISODIOS TÓXICOS

INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente trabajo fue contribuir a una mejor gestión y mitigación del impacto de las toxinas marinas en la salud pública y en la explotación y comercialización de los moluscos mediante la revisión y valoración de diferentes estrategias, regulaciones e iniciativas desarrolladas en el ámbito comunitario e internacional.

Ha habido numerosos intentos de reducir el impacto de las toxinas marinas en la salud pública y en las actividades económicas. La adquisición de capacidad de predicción y el conocimiento de los mecanismos de intoxicación y depuración son acciones importantes puesto que permiten la planificación de las actividades acuícolas. Son igualmente relevantes las iniciativas orientadas a la reducción de la exposición de los moluscos a las microalgas tóxicas y aquellas dirigidas a la eliminación de las toxinas una vez que ya han sido incorporadas a los moluscos tanto las aplicables a los moluscos vivos como aquellas orientadas a la obtención de productos marinos libres de toxinas.

Dado que una vez que los moluscos son contaminados, las estrategias de mitigación son limitadas, la mayor parte de los países han desarrollado programas de monitorización y control del fitoplancton tóxico en las aguas de producción y de las toxinas en los moluscos y han establecido límites y regulaciones para el control de las toxinas en los moluscos. Los aspectos cubiertos por los programas de monitorización y control dependen mucho del país y área geográfica considerada. Algunos de estos programas han recibido el estatus de regulaciones oficiales, estableciendo los requisitos para las áreas de producción y para la comercialización, así como los métodos y los límites para el control sanitario.

En el artículo 11 “**Management of shellfish resources**” se muestra una perspectiva global de la producción de moluscos y de los programas de monitorización de las toxinas marinas, valorándose las iniciativas existentes para el control y mitigación de los episodios tóxicos, las regulaciones relativas a PSP, DSP, ASP, NSP y azaspirácidos y las iniciativas de armonización llevadas a cabo en diferentes ámbitos geográficos.

Al final del capítulo se presenta un resumen y las conclusiones más relevantes del mismo.

ARTÍCULO 11

Management of shellfish resources.

Fernández, M.L., Shumway, S. and Blanco, J. In “ Manual on Harmful Marine Microalgae”. G.M.Hallegraeff, D.M. Anderson and A.D. Cembella (Eds). Monograph on Oceanographic Methodology. Unesco Publishing

24 Management of shellfish resources

M. L. Fernández, S. Shumway, J. Blanco.

24.1 INTRODUCTION

Molluscan shellfish aquaculture has experienced a dramatic worldwide increase in the last decade. Although the species cultured, the farming and harvesting techniques, and the local consumption habits, vary depending on the geographical area, coastal production areas are regularly affected by a range of toxin-producing phytoplankton that even in low concentrations can contaminate shellfish, causing human illnesses and severe economic losses to industry.

There have been many attempts to reduce the impact of phycotoxins on shellfish aquaculture. Knowledge of the rates of intoxicification and detoxification of filter-feeding shellfish is important because selection for shellfish species that accumulate low levels of toxins and show rapid depuration could minimize the effects of toxic outbreaks. Once shellfish product is contaminated, mitigation strategies are relatively limited, and most countries have implemented monitoring programmes to protect public health and reduce economic impacts. Topics covered by these programmes depend on the country but may include monitoring of oceanographic variables (weather, currents, nutrients), toxic microalgal species, and toxin content of seafood. Toxicity is determined by a range of testing procedures and the results are compared with regulatory limits to prevent unsafe products being placed on the market. Some of these programmes have been agreed as official regulations that lay down requirements for production areas and marketing, as well as methods and limits to be used for sanitary control. When reviewing existing regulations, discrepancies in methods and limits are evident. Disparities are especially significant where free trade and unrestricted movement of goods and services exist. The lack of uniformity and in some cases the paucity of regulations can lead to public health risks and unfair competition. Future elimination of trade barriers calls for harmonization of safety requirements. This chapter provides a summary of available information on rates of loss of toxins by bivalve molluscs, a global overview of shellfish production and monitoring programmes, and a summary of available information on regulations regarding paralytic (PSP), diarrhetic (DSP), amnesic (ASP), neurotoxic (NSP) shellfish toxins and azaspiracids. Current activities on harmonization of phycotoxin control approaches carried out in the European Union (EU), in the Asia Pacific Economic Cooperation (APEC) area and in the USA are also described.

24.2 SHELLFISH PRODUCTION WORLDWIDE

Due to a considerable decrease in wild fisheries catches, shellfish production has grown worldwide in the last decade, but this expansion has been especially notable in the Asia-Pacific region. Countries of the Association of Southeast Asian Nations (ASEAN) are traditionally significant consumers of seafood products and rely heavily on them for subsistence and export income. Some of them have become world producers of several

bivalve species. China is by far the main bivalve-culturing country and major world producer of scallops, mussels, clams and cockles, followed in production by Japan, which ranks as the highest consumer of seafoods in the world, and the Republic of Korea (Table 24.1). Indonesia, Malaysia, Taiwan and Thailand are also included among the major ASEAN producing countries. While almost the entire production of Japan is destined for domestic markets, countries such as the Republic of Korea export a significant amount of their production. There is a general trend of increasing export trade from ASEAN countries to Europe, Canada and the United States.

Table 24.1 Production of molluscan shellfish in 1999 by major producing countries (metric tonnes)

	Mussels	Scallops	Clams and cockles	Oysters	Gastropods	Total
Australia	1.693	11.623	1.444	10.731	5.593	31.084
Canada	28.904	57.950	36.835	12.510	1.704	137.903
Chile	26.870	22.383	42.568	5.738	9.546	107.105
China	608.115	712.442	2.492.345	3.007.544	1.801	6.822.247
Denmark	96.215	0	246	8	1	96.470
France	64.621	15.741	11.206	137.161	8.758	237.487
Greece	32.772	0	16	49	0	32.837
Ireland	16.111	1.559	532	7.931	7.579	33.712
Italy	167.876	0	86.462	0	0	254.338
Japan	0	515.645	101.113	205.345	13.109	835.212
Korea, Rep. of	23.227	383	72.475	188.868	9.146	294.099
Malaysia	9.764	0	81.589	198	0	91.551
México	805	1.864	6.210	43.332	9.167	61.378
Netherlands	100.800	306	50.888	3.214	0	155.208
New Zealand	73.977	897	1.577	16.006	1.170	93.627
Peru	14.612	31.726	338	50	6.814	53.540
Philippines	15.498	62	282	13.793	282	29.917
Portugal	286	0	4479	653	196	5.614
South Africa	2.300	0	0	405	510	3.215
Spain	262.015	384	26.197	4.514	1.089	294.199
Thailand	61.800	0	87.133	22.917	0	171.850
Tunisia	8	0	48	0	0	56
Turkey	2.300	68	3.585	840	0	6.793
United Kingdom	17.507	25.137	14.387	1.566	6.261	64.858
United States	5.426	80.064	330.637	177.740	4.891	598.758
Venezuela	451	0	39.024	2.037	0	41.512

Source: Food and Agriculture Organization of the United Nations

Among countries from the American continent, the USA leads in the production of bivalves, being ranked as the second world producer of clams and cockles and third producer of oysters and scallops, followed in importance by Canada which, together with the USA, is seeking new products with more added value (Vieytes and Leira, 2000). The increase in the last few years in Chile's production of scallops and the rise in clam and cockle production of Mexico and Venezuela is noteworthy. Mexico is the second American producer of oysters, and Chile and Peru are the most important South American producers of mussels.

In Europe, the main molluscan shellfish producers are Spain, France, Italy, Denmark and the Netherlands. Total production in 1997 was about 1 million tonnes. Mussel production is of great importance in this area, with Spain, Italy and the Netherlands leading the production of cultured mussels and Denmark the harvest of wild mussels. In recent years, Greece has strongly increased its mussel catch and Ireland has strengthened its mussel industry, mainly destined for export markets. The markets for fresh and frozen mussels are almost exclusively in the EU. Italy leads clam production and France is the major producer of oysters. The Netherlands is the biggest producer of cockles and the United Kingdom the top producer of scallops and gastropods. Export activities are very important in the EU, although exchanges are mainly between Member States. The Netherlands is by far the main mussel-exporting country, exporting mainly live mussels to neighbouring countries such as Belgium and Germany. Other exporting countries are Spain, Ireland, Germany and Denmark. Quantitatively, France, Belgium and Germany are the main importers, while the Netherlands tends to import in times of low production.

In the Pacific region, New Zealand and Australia are important producers of scallops and oysters. In recent years, the mussel production of New Zealand has experienced a sharp increase, with almost the total production destined to be exported as frozen mussels (half-shell product) (data on shellfish production from FAO and Vieytes and Leira, 2000)

The data on shellfish production in Table 24.1 illustrate the importance of seafoods in densely populated geographical areas that strongly depend on these resources for local consumption and where the exploitation of wild and cultured bivalves represents a significant part of their economic production. The impact of toxic phytoplankton on public health and economy can be enormous in developing countries but also in developed countries which, although less vulnerable to phycotoxins in shellfish, have also suffered toxic outbreaks and enormous economic losses in fisheries and tourism.

24.3 PROCESSES INVOLVED IN HARMFUL ALGAL EPISODES

24.3.1. Ingestion and incorporation of toxic or noxious algae and substances.

Some species of microalgae can produce harmful effects on shellfish populations either affecting them directly or by causing toxin accumulation that make them toxic or undesirable to man (reviewed in Blanco-Pérez, 2001). In some cases, large blooms of microalgae modify substantially characteristics of the water such as pH, oxygen content, viscosity, etc., producing delays of shellfish growth, alterations of the typical shape or even mortalities. This alteration of the medium may be, sometimes, also accompanied by the production of substances that can be toxic for some shellfish species, increasing

the probability of producing mortalities, and leading to large economical losses. In some other cases the microalgae produce substances that are accumulated in the shellfish, and, while not having a significant effect on them, turn the organisms undesirable –by giving them a strange color (e.g. the ciliate *Mesodinium rubrum*) or taste (e.g. diatoms of the genus *Rhizosolenia*)- or toxic to man. By far the later one is the most adverse effect.

Shellfish (bivalve molluscs, gastropods, crabs, lobsters and others) accumulate phycotoxins mostly by direct filtration of the algal cells or by feeding on contaminated organisms (e.g. carnivores and scavengers). The accumulation of a particular toxin is regulated by the balance of the toxin intake and loss from/to the environment and by the transformations to/from other toxins. The toxicity of the molluscs depends on the concentration of the different toxins in the soft tissues –that in turn depends on the toxin burden and the weight of the tissues- and also on the potency of each of toxin. Rates of toxin accumulation of filter-feeding shellfish from toxic algae are toxin- and species-specific because the food ingestion of some mollusc species can be affected by the presence of toxic algae, and also because mollusc species differ substantially in their retention capability for each group of toxins. Some species of bivalve are known to reduce or completely suppress the toxic phytoplankton ingestion, in some cases to avoid toxic food but in some other because an adverse effect of the toxic species on the mechanism of the food capture (reviewed in Blanco-Pérez, 2001). Several PSP producing species of the genus *Alexandrium* have been shown to produce both kind of responses on several shellfish species (see Shumway and Cucci, 1987, Bricelj et al 1998, Lassus et al. 1999 for PSP). One species of particular interest is the northern quahog or hard clam, *Mercenaria mercenaria* which during an outbreak of a bloom of *Alexandrium tamarense* in Massachusetts, remained not toxic when most bivalve species attained large toxin concentrations. Studies in our laboratory (Shumway) have shown that in the presence of *A. tamarense* the quahog first retracts its siphons and then completely isolates itself from the external environment by means of shell valve closure. Efforts to induce toxicity by feeding *A. tamarense* were unsuccessful.

No effect on the feeding behavior by DSP producing species has been found up to date, neither in natural episodes –usually produced by *Dinophysis* species very low concentration in the water- nor in the experimental intoxicification of *Argopecten irradians* with *Prorocentrum lima* (Bauder et al. 2001). *Pseudo-nitzschia multiseries* which produces ASP toxins, had no effect on *Mytilus californianus* (Whyte et al 1995) but induced the valve closure in *Crassostrea gigas* (Jones 1995)- The same effect is produced by *Gymnodinium breve* (NSP) on *C. gigas* and *Braquiodontes recurvis* (Sievers 1969).

The toxin contents and composition of the cells has been shown to have some effect, at least in PSP intoxicification of *M. edulis* and *M. mercenaria* (Bricelj et al. 1990).

As with the organic matter, not all the toxin contained in the cells is absorbed by the mollusc. The main variables that seem to control the process are the gut passage time (the time that the food is maintained in the digestive system) and the digestibility and/or the postingestive selection of the toxic cells (Morono et al. 2001; Bauder et al 2001). Toxic history and genetic differences have also an effect on the incorporation of toxins into molluscs.

Toxicity of individual shellfish in any given area is highly variable (see White et al., 1993; Chebib et al., 1993, for PSP; Gilgan et al. 1990; Douglas et al. 1997; Arévalo

et al. 1998; Blanco et al. 2002a,b, for ASP), probably mainly as a consequence of the also high inter-individual variability in the rates of food acquisition of most molluscs.

24.3.2. Detoxification

The rate of toxin loss is also toxin- and species-specific. The majority of available information concerns bivalve molluscs (see also Shumway, 1990 and Bricelj and Shumway, 1998), and, as these are the species most commonly reared in aquaculture, they are focused on here. Table 24.2 summarizes selected data on toxin retention for a number of bivalve species.

Little is known about the factors that regulate the detoxification rate. Prakash et al. (1971) showed that PSP detoxification varied with season in the eastern coast of Canada and it is frequently assumed that low water temperatures retard toxin loss (see Shumway and Cembella 1993). Notwithstanding, temperature seems to have different effects for different toxins and species (no effect: PSP from *Saxidomus giganteus* (Madenwald 1985), *Mytilus galloprovincialis* (Blanco et al. 1997); slower loss: DSP from *M. galloprovincialis* (Blanco et al. 1999); faster loss: ASP from *Mytilus edulis* (Silvert and Subba Rao, 1993; Novaczek et al. 1992), and *Pecten maximus* (Blanco et al., in prep).

Among the other factors studied to date, probably the food amount is the most important one for PSP and DSP, increasing slightly the detoxification rate (Sampayo et al. 1990; Marcaillou-Le Baut et al. 1993; Blanco et al. 1997, 1999). Metabolic processes in general seem to have little or no influence in regulating the loss of DSP and PSP toxins from mussels *M. galloprovincialis*, as no difference was found between groups with completely aerobic and partially anaerobic metabolisms (Morono et al. 1998). However, it seems that metabolic processes may affect domoic acid detoxification in *Pecten maximus* (Blanco et al., unpublished data).

The rate of detoxification is highly dependent on the site of toxin storage within the animal. Toxins in the digestive gland are usually eliminated much more readily than toxins bound in other organs, with the noticeable exceptions of DSP toxins in *Argopecten irradians* (Bauder et al. 2001) and domoic acid in *P. maximus* (Blanco et al. 2002).

24.3.3. Toxin transformations.

Most toxins undergo transformation in the organisms where they are accumulated, in some cases because the conditions (pH, redox potential, etc) are different from the producer, and in some other cases because of the enzymatic activity of the accumulator. As toxin analogues usually differ in their toxic potency, the transformations produce a change in the whole toxicity of the animal without any input or loss of toxin. Many PSP toxins interconvert easily (see Bricelj and Shumway 1998 for bivalves, Arakawa et al. 1998, for crabs), producing increases or decreases of the toxicity. A suite of derivatives of okadaic acid and dinophysistoxins 1 and 2 (e.g. diol esters, DTX4-like compounds) exhibiting different toxic potency (can be present in the phytoplankton cells (eg.) and, at least in some cases, they can be reverted to the parent toxins by the enzymes (during digestion or after it) of the accumulator inducing, very likely, significant changes in its toxicity. Simultaneously, OA, DTX1 and DTX2 can be converted to the corresponding acyl-derivatives (DTX3) (Fernández et al. 1998; Morono et al. in press). ASP toxins have been less studied, with regard to this aspect.

Table 24.2 Approximate times of toxin retention for various species of bivalve mollusc (time for toxin levels to fall below either quarantine or detection levels). Algal species are as given in original publications^a

Species	Toxin source	Retention time	References
<i>Ameghinomya antiqua</i>	Probably <i>Dinophysis acuta</i>	>6 months	Lembeye et al. (1993)
<i>Anadara maculosa</i>	<i>Pyrodinium bahamense</i>	6 weeks	Worth et al. (1975)
<i>Argopecten irradians</i>	<i>Prorocentrum lima</i>	>11<60 days (viscera)	Bauder et al. (2001)
<i>Arctica islandica</i>	<i>Protogonyaulax tamarensis</i>	2 months <i>in vivo</i>	Shumway (unpublished)
<i>Aulacomya ater</i>	Probably <i>Dinophysis acuta</i>	6 months	Lembeye et al. (1993)
<i>Choromytilus meridionalis</i>	<i>Gonyaulax catenella</i>	3 months	Popkiss et al. (1979)
<i>Clinocardium nuttalli</i>	<i>Gonyaulax acatenella</i>	9 weeks	Quayle (1965)
<i>Crassostrea cucullata</i>	Not specifed, probably <i>Pyrodinium bahamense</i>	2 months	Karunasagar et al. (1984)
<i>Crassostrea echinata</i>	<i>Pyrodinium bahamense</i>	3 weeks in closed system; longer periods <i>in vivo</i>	MacLean (1975)
		4 months	Worth et al. (1975)
<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Gonyaulax acatenella</i>	1–9 weeks	Quayle (1965, 1969); Sharpe (1981)
		1 month	Sribhibhadh (1963)
<i>Crassostrea iridescens</i>	<i>Gymnodinium catenatum</i>	>1 month	Mee et al. (1986)
<i>Crassostrea virginica</i>	<i>Gymnodinium breve</i>	2–6 weeks	Morton and Burklew (1969)
<i>Meretrix casta</i>	Not specified, probably <i>Pyrodinium bahamense</i>	1 month	Karunasagar et al. (1984)
<i>Mercenaria mercenaria</i>	<i>Alexandrium tamarense</i>	2.1–3.6 weeks	Bricelj et al (1991)
<i>Modiolus auriculatus</i>	<i>Pyrodinium bahamense</i>	6 weeks	Worth et al. (1975)
<i>Modiolus modiolus</i>	<i>Gonyaulax tamarensis</i>	Up to 60 days ^b	Gilfillan et al. (1976)
<i>Mya arenaria</i>	<i>Gonyaulax acatenella</i>	5 weeks	Quayle (1965)
	<i>Gonyaulax tamarensis</i>	4–6 weeks	Prakash et al. (1971); Bicknell and Collins (1973)
		Up to 45 days ^b	Gilfillan et al. (1976)
<i>Mytilus californianus</i>	<i>Gonyaulax catenella</i>	<1 month	Sommer and Meyer (1937); Sharpe (1981)
<i>Mytilus edulis</i>	<i>Protogonyaulax tamarensis</i>	10 days–7 weeks	Oshima et al. (1982)
		Up to 50 days	Gilfillan et al. (1976); Prakash et al. (1971)
	<i>Gonyaulax acatenella</i>	11 weeks	Quayle (1965)
		4 weeks	Sharpe (1981)
	<i>Gonyaulax excavata</i>	2–3 weeks	Gaard and Poulsen (1988)
	<i>Dinophysis</i> spp.	1 week	Haamer et al (1989)

Species	Toxin source	Retention time	References
<i>Mytilus edulis</i>	<i>Dinophysis</i> spp.	8 weeks	Marcaillou–Le Baut et al. (1990)
	<i>Dinophysis</i> spp.	8–>42 days ^b	Marcaillou–Le Baut et al. (1993)
	<i>Dynophysis</i> spp.	>10 months	Sechet et al (1990)
	<i>Dinophysis</i> spp.?	10 days	Quilliam et al. (1993)
	<i>Prorocentrum</i> spp.? probably <i>Dinophysis acuta</i>	6 months	Lembeye et al. (1993)
<i>Ostrea edulis</i>	<i>Alexandrium tamarense</i>	>6 weeks	Shumway et al. (1990)
<i>Patinopecten yessoensis</i>	<i>Protogonyaulax tamarensis</i>	6 weeks–5 months	Oshima et al.(1982); Iioka et al. (1964)
<i>Perna canaliculus</i> ^c	<i>Nitzschia pungens</i>	2 days	MacKenzie et al. (1993)
	f. <i>multiseries</i>		
<i>Placopecten magellanicus</i>	<i>Protogonyaulax tamarensis</i>	6 months in closed system; can be toxic year round <i>in vivo</i>	Bourne (1965); Shumway et al. (1988)
	<i>Protogonyaulax pungens</i> f. <i>multiseries</i>	>2 weeks (viscera)	Van Apeldoorn et al. (1999)
<i>Protothaca staminea</i>	<i>Protogonyaulax acatenella</i>	5 weeks	Quayle (1965)
<i>Saxidomus giganteus</i>	<i>Protogonyaulax acatenella</i>	2+ years	Quayle (1965); Anonymous (1974)
<i>Saxidomus solidissima</i>	<i>Gonyaulax catenella</i>	3 months–2.5 years	Quayle (1969)
<i>Siliqua patula</i>	<i>Pseudonitzschia</i> spp.?	>2 years	Wekell et al. (1993); Drum et al. (1993); Horner et al. (1993)
<i>Spisula solidissima</i>	<i>Alexandrium tamarense</i>	3 months–3+ years	Shumway et al (1994; unpublished)
<i>Spondylus</i> sp.	<i>Pyrodinium bahamense</i>	Still highly toxic after months	Worth et al. (1975)
<i>Tresus capax</i>	<i>Gonyaulax acatenella</i>	11 weeks	Quayle (1965)
<i>Venerupis japonica</i>	<i>Gonyaulax acatenella</i>	5 weeks	Quayle (1965)

Gonyaulax and Protogonyaulax = Alexandrium; Nitzschia = Pseudo–nitzschia.
 Dependent on initial level of toxicity.
 Laboratory study only; toxic organisms not identified in natural habitat.

Notwithstanding, a number of DA isomers that bind to the kainate receptor less strongly (see Wright and Quilliam 1995) have been described and consequently the situation may be the same than that reported for PSP and DSP toxins.

24.3.4. Changes in shellfish biomass.

The toxicity of an organism depends not only on the toxin burden and toxin potency but also on the amount of biomass in which the toxins are distributed. Any alteration of the weight of soft tissues, not paralleled by an equivalent modification in the toxin burden, produces changes in the toxicity per unit of biomass. For PSP and DSP contaminated shellfish, weight is not lost at the same rate than the toxins). In such cases, when the weight decreases, the same amount of toxin is concentrated in a smaller biomass, and the toxicity per unit of biomass of the organism increases. On the other hand, when the organism increases its weight the toxicity per unit of biomass decreases because the toxins are “diluted” in a larger biomass. Those situations have been found in several studies both in natural and laboratory conditions (see Bricelj and Cembella 1995; Blanco et al., 1997, 1999). With some combinations of species and toxins, the situation may be different from that already described. Thus, the loss of domoic acid from the king scallop, seems to be related to loss of weight (Blanco et al. 2002) and consequently toxicity per unit of biomass is relatively independent from weight changes.

24.3.6. Toxin retention time.

Toxin retention time by shellfish depends on the mechanisms analyzed above and they are, therefore, species- and toxin- specific (Table 24.2). The differences of retention time are very large. The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis* retain domoic acid for hour or days (Novaczek et al, 1992; Blanco et al. 2002a) while the scallop *Pecten maximus* (Blanco et al. 2002b) retains this toxin for more than two years with a behaviour similar to that of *Saxidomus giganteus* and *Spisula solidissima* with PSP toxins (Quayle, 1965; Blogoslawski and Stewart, 1978; Chambers and Magnusson, 1950; Cembella and Todd, 1993; Shumway et al., 1994).

Few data are available on the retention times of toxins by crabs and carnivorous gastropods. The general trend for PSP toxins appears to be towards long-term retention (Desbiens and Cembella, 1993; Shumway et al., 1995; Shumway, unpublished data) but ASP can be eliminated from dungeness crab *Cancer magister* at a relatively fast rate (Lund et al. 1997).

Generalizations regarding the uptake and retention of phycotoxins by shellfish should be avoided and the species- and toxin- specific characteristics should be taken into account before choosing a species to be reared in areas prone to toxic algal blooms, and when designing monitoring and sampling regimes.

24.4 STRATEGIES TO AVOID INTOXICATION AND INTOXIFICATION OF SHELLFISH.

The exposure of shellfish to microalgal blooms can be reduced mainly by two procedures: reducing the algal biomass bloom or changing the location of the shellfish population. So far, the only strategy that has been proved to be efficient against the development of an algal bloom was the dispersion of clay over a proliferation of *Cochlodinium polykrikoides* in Korea (Kim et al. 1998), but it presents the drawback of an obvious environmental impact. Other strategies (reviewed in Blanco-Pérez 2001 and partially in Elbrachter and Schnepff, 1998) such as the use of ultrasounds or chlorine to kill the algal cells or the use of several viral, bacterial, fungus or protozoan parasites that lise cells, have been experimentally tried, but they have not been used in real

blooms. The second possible way of actuation consists in relocating the shellfish population (specially if they are cultured) in, or restrict the culture to, places or depths at which the concentration of the harmful population is minimal (Desbiens and Cembella, 1993; Lodeiros et al. 1998; Franzosini et al., 2000).

24.5 STRATEGIES TO ELIMINATE TOXINS FROM SHELLFISH.

Two groups of techniques are being used to eliminate toxins from the mollusc. The aim of the first group is to obtain live non-toxic mollusc, and includes techniques such as temperature or salinity stress, ozone or chlorine treatments, transplantation, etc that accelerate the loss of toxins from the organisms or, at least, prevent re-intoxication. The aim of the second group is to obtain products free of toxins after applying specific processing procedures ..

24.5.1. Strategies to obtain living shellfish free of toxins.

Various attempts have been made to detoxify live shellfish contaminated with paralytic shellfish poisons to reduce the duration of 'off-market' times. The most obvious method is to transfer shellfish to waters free of the toxic organisms and with environmental conditions that favor depuration. Unfortunately, the small effect of the environmental conditions on PSP and DSP detoxification rate of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Blanco et al 1997, 1999) makes transplantation more useful to prevent re-intoxication than to increase the depuration rate. Notwithstanding, Blanco et al. (manuscript in prep) recently found that the king scallop *Pecten maximus* depurates domoic acid much faster when suspended in rafts than in their natural conditions. Transplantation is being used in several countries to take benefit in those two aspects. Detoxification of PSP toxins using temperature or salinity stress has also been tried with marginal success (Gilfillan et al., 1976; Blogoslawski and Neve, 1979). Instantaneous electrical shock treatments accelerated toxin excretion in scallops (Kodama et al., 1989). Reduced pH has been tried as a means of detoxifying butter clams, but with no success (Anonymous, 1966; Neal, 1967). Chlorination has been used in France; however, this process alters the flavour of the shellfish and thus decreases marketability.

Ozone has been touted as an effective means of reducing toxicity although its usefulness is questionable. Several early studies reported ozone to be effective in the inactivation of PSP toxins in shellfish exposed to *Alexandrium tamarense*, *A. catenella* and *Karenia brevis* blooms (Thurberg, 1975; Blogoslawski et al., 1975, 1979; Dawson et al., 1976; Blogoslawski and Stewart, 1978). Blogoslawski et al. (1973) also suggested that ozone could be used to inactivate *Karenia (Gymnodinium) brevis* toxins. More recently, preliminary studies by Gacutan et al. (1984, 1985) demonstrated that both ozone gas and PVP-iodide-iodine may effectively inactivate PSP toxins from *Perna viridis* contaminated by *Pyrodinium bahamense*. However, a subsequent study by White et al. (1985) produced results contradictory to previous studies in that no detoxification occurred in *Mya arenaria* exposed to ozone treatments. In a review (Blogoslawski, 1988), it was again suggested that ozonized sea water can be of value in detoxification of shellfish contaminated recently by the vegetative cells of toxic (PSP) dinoflagellates. In a study during a red-tide outbreak, it was shown that ozone treatment of the sea water does prevent shellfish (*Mytilus edulis*, *Mya arenaria* and *Geukensia demissa*) from accumulating paralytic shellfish poison. Blogoslawski concluded that inactivation could be achieved in bivalves exposed to and contaminated by motile PSP dinoflagellate cells without measurably altering the physical state of the treated bivalves and that this

inactivation could be achieved in a marketable species such as *Mya* within an economically feasible time-frame (Blogoslawski et al., 1979). Most recently, Fletcher et al. (1998) concluded that ozone was ineffective in reducing toxins from *K. brevis* in the oyster *C. gigas*. Ozone is useless in detoxifying cysts or in bivalves that have ingested cysts or have the toxins bound in their tissue over long periods. Furthermore, detoxification of algal toxins, especially paralytic shellfish poisons, over long periods is not economically feasible. We do not recommend ozone as a practical or safe means of eliminating algal toxins from shellfish. At present the economic feasibility of efficiently detoxifying shellfish on a large scale in artificial systems is not promising, perhaps with the exception of the oyster *Crassostrea gigas* contaminated with PSP toxins which responds to increased food supply with a substantial increment in its rate of toxin loss (Lassus pers., com.) and that has large commercial value. In areas prone to regular outbreaks of toxic algal species, aquaculturists and commercial fishermen alike must still depend on reliable monitoring systems to warn of toxic shellfish and plan their activities accordingly. Through the combined efforts of an intensive monitoring programme and culture of 'rapid release' species (e.g. *Mytilus edulis*), bivalves known to avoid toxic dinoflagellates (e.g. *Mercenaria*, most oysters) or scallops (adductor muscles rarely if ever toxic), economic losses can be kept to a minimum (see also Shumway et al., 1988).

24.5.2. Strategies to obtain shellfishery products free of toxins.

The second group of techniques range from the simple process of selective evisceration to cooking or more complex industrial processing techniques. Some species accumulate toxins preferentially in one or in a few organs. In these cases an easy way to eliminate most of the toxin is to remove such organ/s (evisceration). Obviously, this procedure can only be used when the size of the species is big enough to allow the dissection of the toxic anatomical part and the species has enough commercial value to compensate the usually large economical cost of dissection. This procedure is currently being applied in the EU for the king scallop *Pecten maximus* contaminated with ASP toxins. Recent EU legislation (Decision 2002/226/EC) has established an exception to the general regulation for the exploitation of bivalve molluscs, in order to allow this procedure under specific conditions, that is being useful in mitigating the economic impact of the very long detoxification time of this species. The same procedure could be used with other bivalve species such as the razor clam *Siliqua patula* with ASP toxins (Horner et al 1993), or *Argopecten irradians* with DSP toxins (Bauder et al., 2001), but also with gasteropods as *Haliotis tuberculata* and *Haliotis midae*, that concentrate most of PSP in epipodial fringe (Bravo et al., 1999, 2001; Pitcher et al., 2001).

Very recently, the basis for a procedure to eliminate DSP toxins from molluscs by means of critical point extraction have been set up by González et al. (2002), pointing to an interesting approach to eliminate DSP toxins but also other lipophilic toxins. The technique requires dehydration of the product and therefore it will be only useful for products that require or, at least, tolerate this process.

Cooking has also been promoted as a possible means of detoxifying shellfish contaminated with paralytic shellfish poisons. Although cooking does not eliminate the danger of intoxication, it may effectively reduce toxicity to safe levels if initial levels of toxicity are low. Pan-frying seems to be more effective to reduce PSP levels than other

methods of cooking (Medcof et al., 1947; MacDonald, 1970). When clams or mussels are steamed or boiled, toxins lost from the tissues are contained in the cooking liquid rendering the fluids extremely toxic. Vieites et al. (1999) showed that more than 30% of the PSP toxins contained in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) are transferred to the water after cooking them at 97°C for two minutes, while real destruction of the toxin was about 20%.

Commercial canning has been shown to reduce toxicity (paralytic shellfish poisons) of soft-shell clams, *Mya arenaria*, by as much as 90%. A toxicity level of 160 µg STXeq 100 g⁻¹ for soft-shell clams and mussels (*Mytilus edulis*) to be canned was established in the 1950s in Atlantic Canada and remains in effect today (Cembella and Todd, 1993). Noguchi et al. (1980) (see also Nagashima et al., 1991) showed that toxicity levels of PSP-infested scallops could be reduced during canning processes. They demonstrated that during retorting (110 °C, 80 min, or 122 °C, 22 min) most of the PSP toxins could be eliminated (maximum initial level 102 MU g⁻¹ digestive gland) whereas heating (70 °C, 20 min) followed by washing was less effective in reducing the toxicity below the quarantine limit of 4 MU g⁻¹. Recent efforts in Spain (Berenguer et al., 1993) have demonstrated that toxicity levels of Mediterranean cockles (*Acanthocardia tuberculatum*) may be significantly reduced via canning. Total toxicity of cockles (initial levels of approximately 800 g STXeq 100 g⁻¹) was reduced to < 35 g STXeq 100 g⁻¹ after cooking. These authors demonstrated that the decreases in PSP toxicity obtained by commercial processing are sufficient to warrant canning as a practical means of obtaining a legal and acceptable product when the toxin levels are moderate. Similar attempts have been made to detoxify surfclams (*Spisula solidissima*) via canning, but results to date are inconclusive. During the canning process of PSP contaminated *Mytilus galloprovincialis*, about 30% of the toxin goes to the packing liquid and about 33% is destroyed (when packaged in brine) (Vieites et al., 1999). It has been also shown that the thermal treatments associated with canning induce transformations between the different PSP toxins, with the consequent changes in toxicity (Vieites et al., 1999; Indrasena and Gill, 1999). The effectiveness of canning as a means of reducing PSP-toxicity levels below quarantine levels seems to be dependent on the initial profile of toxins and , in some cases, on the initial level of toxicity and should be approached with great caution.

Domoic acid was shown to decrease from the scallop tissues using freezing followed by canning (Leira et al. 1998), but it seems that only the freezing step had an effect in reducing the overall toxin content of the product

With the exception of the study by Berenguer et al. (1993), no useful methods have been devised for effectively reducing phycotoxins in contaminated live shellfish. All methods tested to date have been unsafe, too slow, economically unfeasible or yielded products unacceptable in appearance and taste. Given the global increase in harmful algal blooms and the continually growing interest in culture of bivalve molluscs, further efforts are needed to develop effective means of detoxifying shellfish contaminated with phycotoxins. Failing the development of any such methods, increased efforts need to be expended in monitoring shellfish for the presence of phycotoxins.

24.6 STRATEGIES TO MINIMIZE THE RISK OF TOXIC SHELLFISH FOR HUMAN HEALTH

The strategies to minimize the risk for human health are based on the definition of allowable toxin levels in seafoods and in the determination of those levels in the exploited shellfish populations, which includes the use of suitable methodology and the establishment of adequate monitoring programmes.

24.6.1 Allowable toxin levels and methods: the basis of the regulation

Regulations on action levels should ideally be based on a risk assessment that comprises hazard identification (which involves identification of the toxins causing adverse health effects), hazard characterization (which implies evaluation of the adverse health effects associated with the presence of the toxins in seafoods), exposure assessment related to the evaluation of likely intake of phycotoxins, and risk characterization (which involves quantitative estimations of the probability of occurrence of adverse health effects in a given population) (Aune, 2001).

Epidemiological data and toxin kinetics studies, action mechanism, target organs and dose-response relationships are required for the risk assessment process. In addition, the capability of testing procedures to identify and quantify toxin levels in food should be taken into account when establishing regulations. In the case of some marine toxins, especially some polyether toxins, there is a lack of such studies, and the action levels have been set on the basis of sparse toxicity data mainly originating from human poisoning episodes, the detection limits of the available methods or following the specifications of other countries. Robust toxicological studies are lengthy and expensive to conduct and involve the use of large amounts of pure toxins, which are not available in most cases.

Accurate methods of quantification have to be available, because legislation calls for methods of control. However, the development and validation of suitable testing methods has also been hampered by the lack of pure toxins and certified reference materials (Van Egmond et al., 1992). Most countries still rely on animal bioassays to detect PSP and DSP but the ethical aspects of these tests have led to growing resistance from animal-welfare groups. It should also be borne in mind that it is not realistic to establish an action level lower than the actual limit of detection, although this might be desirable from the toxicity point of view. The elucidation of new toxins, as well as the wide range of seafood that can act as toxin vectors, make the establishment of rational guidelines and regulations more difficult. Despite the dilemmas, a number of countries have established limits and regulations for phycotoxins in shellfish.

Paralytic shellfish poisoning (PSP)

Among all the seafood poisonings, PSP represents one of the most severe threats to public health, affecting most coastal areas in the world. Saxitoxin (STX) and analogues are mainly produced by a number of dinoflagellates belonging to the genera *Alexandrium*, *Gymnodinium* and *Pyrodinium* (Yasumoto and Murata, 1993). Although bivalve molluscs are the main PSP vectors, gastropods, crustaceans and pelagic fish have also been reported as vectors of these toxins (Shumway, 1995). Many affected countries have established regulations including methods and action limits. Table 24.3 shows countries known to have PSP regulations in force.

The main method used for regulatory purposes is the mouse bioassay (AOAC, 1990) that has been validated and standardized by the Association of Official

Table 24.3 Regulations for paralytic shellfish poisons in various countries

Country	Product	Toxin(s)	Tolerable level ^{a,b}	Method of analysis	Remarks
Australia			80 µg 100 g ⁻¹	Mouse bioassay	
Canada	Molluscs	PSP	<80 µg 100 g ⁻¹	Mouse bioassay	Products having levels between 80–160 µg 100 g ⁻¹ may be canned
European Union ^c	Bivalve molluscs	PSP	80 µg 100 g ⁻¹	(Mouse) bioassay in association if necessary with a chemical detection method	If the results are challenged, the reference method is the biological one
Guatemala	Molluscs	Saxitoxin	400 MU 100 g ⁻¹	Mouse bioassay	
Hong Kong China	Shellfish	PSP	400 MU 100 g ⁻¹	Mouse bioassay	
Japan	Bivalves	PSP	400 MU 100 g ⁻¹	Mouse bioassay	
Korea, Rep. of	Bivalves	Gonyautoxins	400 MU 100 g ⁻¹	Mouse bioassay	
New Zealand	Shellfish	PSP, NSP, DSP, ASP		HPLC method	Regulations being developed
Norway	All types of mussel	PSP	180 µg 100 g ⁻¹	Mouse bioassay	
Panama	Bivalves	PSP	400 MU 100 g ⁻¹	Mouse bioassay	
Philippines			40 µg 100 g ⁻¹		
Singapore	Bivalves	Saxitoxin	80 µg 100 g ⁻¹	Mouse bioassay	
United States	Bivalves	PSP	80 µg 100 g ⁻¹	Mouse bioassay	ISSC co-ordinates the Shellfish Programs administered by individual states
Uruguay	Bivalves	PSP	80 µg 100 g ⁻¹	Mouse bioassay	
Venezuela	Bivalves	PSP	80 µg 100 g ⁻¹	Mouse bioassay	

Analytical Chemists (AOAC). This reference method is the only procedure recognized internationally for quantifying PSP toxicity, although with some variations in the acceptable regulatory level and in the units used for expression of the toxicity: 40 µg PSP/100 g, 80 µg PSP/100 g or 200 MU/100 g, 400 MU/100 g (Van Egmond et al., 1992). Most countries have agreed on 80 µg saxitoxin (STX) equivalent/100 g shellfish meat.

The effectiveness of some procedures (evisceration, canning, etc.) in reducing PSP toxicity has led some countries to establish different limits depending on the form of consumption of the shellfish. Thus, in Canada and the United States, shellfish destined for canning or subjected to an evisceration step might be harvested with PSP toxin amounts higher than 80 µg/100 g (Cembella and Todd, 1993; NSSP, 1990). In the case of EU legislation, the application of detoxification procedures is limited by Council Directive 91/492/EEC that prohibits the harvesting of toxic shellfish. There is only one exception (in the case of PSP), and this applies to the species *Acantocardia tuberculata* destined to be canned, allowing Spain to authorize harvesting when PSP levels in the edible parts exceed 80 µg STXeq per 100 g tissue but are less than 300 µg STXeq per 100 g tissue (Decision 96/77/EC). The bivalves must undergo a heat treatment clearly defined in the Annex of the EU Decision, the final product must not contain a PSP toxicity level detectable by the mouse bioassay, and each lot must be tested (Burdaspal et al., 1998).

Diarrhetic shellfish poisoning (DSP)

Among all the groups of marine toxins, those included in the DSP group are the subject of greatest controversy. Three groups of toxins have historically been included in the DSP group: okadaic acid (OA) and dinophysitoxins (DTXs) produced by *Dinophysis* and *Prorocentrum species*, pectenotoxins (PTXs) produced by some *Dinophysis* species and yessotoxins (YTXs), produced by *Gonyaulax grindleyi* and *Lingulodinium polyedra* (Yasumoto et al., 1989; Yasumoto and Murata, 1990; Satake et al., 1998; Tubaro et al., 1998). These bioactive compounds share polyether cyclic structure and solubility properties, and extraction procedures and conventional mouse bioassays do not discriminate among them. However, their biological activity and toxicological properties are significantly different. There is no general consensus as to which liposoluble toxins should be regarded as DSP toxins, which ones should be monitored and regulated and which are the most appropriate testing procedures and acceptable levels.

Concerning sanitary control of DSP toxins, there are disparities in methods and in the criteria for positive results. Mammalian bioassays are widely applied for DSP toxicity determination. However, there are great differences in the performance of the procedures. Assay selectivity, specificity and toxin recovery depend greatly on the selection and ratio of the organic solvents used for extraction. Bioassay procedures as diverse as the oral dosage rat bioassay (Kat, 1983) and the intra-peritoneal injection mouse assay are not equivalent, because the former technique quantifies only the diarrhetic effect of certain DSP toxins whereas the latter assay provides an estimate of total DSP toxicity (Cembella et al., 1995).

Regarding regulatory levels, most countries have set the limit at the detection limit of the analytical method used. The first country to establish a limit was Japan – 5 MU/100 g shellfish tissue, based on an epidemiological study (Yasumoto et al., 1978). This limit has also been established in the Republic of Korea and New Zealand. In

practice, most countries applying mouse bioassays use survival time for the determination of the toxicity, but without a consensus on the appropriate observation period, the acceptable criteria can vary between 'two out of three mouse deaths in less than 5 h' to 'two of three mouse deaths in less than 24 h'.

Chile, Thailand, Turkey, Uruguay and Venezuela regulate DSP on the basis of the Yasumoto mouse bioassay (1978) with a survival time of 24 h as the criterion for a positive result. Canada and the USA have no official regulations on DSP, although Canada may issue informal advice on positive results by mouse assay and/or the fluorescence high-performance liquid chromatography (HPLC) method.

Regarding DSP control in the European Union, the EU Directive 91/492 established that the customary biological method must not give a positive result for the presence of DSP in the edible part of the molluscs, but it did not clarify the interpretation of a positive results and which biological methods should be used. An important progress has been recently made, with the approval of the Decision 2002/225/EC that lays down detailed rules for the implementation of the Directive 91/492 as regards the maximum levels and the methods of quantification of OA and Dinophysistoxins, Pectenotoxins, Yessotoxins and Azaspiracids in bivalve molluscs, echinoderms, tunicates, and marine gastropods. Regarding maximum levels, the following has been stated: A) The maximum level of okadaic acid, dinophysistoxins, and pectenotoxins, together shall be 160 µg of okadaic acid equivalents/ kg edible part (the whole body or any part edible separately). B) The maximum level of yessotoxins shall be 1 mg of yessotoxin equivalents/ kg edible part (the whole body or any part edible separately). C) The maximum level of azaspiracids shall be 160 µg of azaspiracid equivalents/ kg edible part (the whole body or any part edible separately).

Concerning detection methods, the new Decision states that in addition to biological testing methods, alternative detection methods such as chemical methods and in vitro assays should be accepted if it is demonstrated that the performance of the chosen method is not less effective than the performance of the biological method and that their implementation provides an equivalent level of public health protection. The compounds to be detected are: OA and Dinophysistoxins, PTX1 and PTX2, YTX, 45 OHYTX, homo YTX and 45 OH homo YTX AZA1, AZA2 and AZA 3. However, if new analogues of public health significance are discovered they should be included in the determinations. Standards have to be available before chemical analysis will be possible and total toxicity will be calculated using conversion factors based on the toxicity data available for each toxin. The performance of these methods should be defined after validation following an internationally agreed protocol. Concerning biological methods, it is stated that a suite of mouse bioassay procedures differing in the test portion and in the solvents used for the extraction and purification steps can be used, but that sensitivity and selectivity depend on the choice of the solvents and that this should be taken into account when making a decision on the method to be used in order to cover the full range of toxins. With regard to the mouse bioassay, it has been established that the death of two out of three mice within 24 hours after inoculation into each of them of an extract, equivalent to 5 g of hepatopancreas or 25 g of whole body, should be considered as a positive result for the presence of one or more of the toxins of the groups regulated in the Decision at levels above those allowed.

Although the full implementation of this new Decision on the basis of chemical methods and/or in vitro assays still requires big efforts on the development of toxin

standards, toxicological studies and validation of alternative methods, it represents an important step towards harmonization of phycotoxin control approaches.

Amnesic shellfish poisoning (ASP)

ASP is produced by the ingestion of seafood contaminated with domoic acid (DA), an excitatory amino-acid produced by some species of the pennate diatom genus *Pseudo-nitzschia*. The first toxic outbreak took place in Canada in 1987 and toxic episodes, although not human poisonings, have been reported in other regions. Countries that have established regulations for ASP are Canada, the United States, New Zealand (Trusewich et al., 1995; Wright et al., 1989; NSSP, 1990), Chile, Peru, and European Union Member States (EU Directive 91/492/EEC amended by Directive 97/61/EC). The limit is 20 mg/kg edible meat. The US Federal Food and Drug Administration (FDA) has set a quarantine level of 30 ppm of DA in cooked viscera of dungeness crabs (Shumway, 1995). HPLC methods have been established for regulatory purposes.

In order to minimize the economic impact produced by the slow ASP detoxification process of certain *pectinidae*, the EU has recently approved the Decision 2002/226/EC, that allows the harvesting of *Pecten maximus* and *Pecten jacobaeus* with DA levels higher than 20 mg / kg and lower than 250 mg / kg if they are destined to be placed on the market after total removal of hepatopancreas, soft tissues or any other toxic contaminated part. On the basis of this Decision, a restricted harvesting regime of scallops with DA concentration (whole body) > 20 µg / g and intended to be processed, can be initiated if DA concentration in whole scallop (whole body) is < 250 µg / g and if the DA concentration of the anatomical parts intended to be placed on the market and analyzed separately, (edible parts), is < 4.6 µg / g DA. The latter condition was introduced to take into account the large inter-animal variability which exists in the concentration of DA in scallop organs. It is not a lowering of the regulatory limit. It assists in ensuring that the chance of the DA concentration in the scallop edible part exceeding 20µg/g is less than 1 in 1000 upon harvesting (probability “p” of 0.1%). It is based on the analysis of 10 pooled individual edible parts and a 50 % coefficient of variation (as a measure of inter-animal variability in DA concentrations).

In addition to the conditions above for allowing harvesting, additional requirements concerning sampling, number of individuals to make up the analytical sample, transport conditions, authorized establishments, testing of the end product and traceability measures have been also established in the EU Decision.

Neurotoxic shellfish poisoning (NSP)

NSP is a seafood intoxication produced after the ingestion of shellfish contaminated with brevetoxins produced by the dinoflagellate *Karenia (Gymnodinium) brevis* and related species. The United States and New Zealand are currently the main areas affected directly by NSP (MacFarren et al., 1965; Ishida et al., 1995). The testing procedure in use in the USA is the mouse bioassay (APHA, 1985) and the acceptable level is 20 MU/100 g. In New Zealand, a mouse bioassay equivalent to the APHA method (Hannah et al., 1995) is in use and 20 MU/100 g is also employed as acceptable level (Trusewich et al., 1995). The EU Directive makes no mention of NSP toxins as they have not been reported to occur at significant levels in European coastal waters.

Azaspiracid shellfish poisoning (AZP)

Azaspiracids Poisoning (Ofuji et al., 1999, añadir) is caused by the ingestion of shellfish contaminated with Azaspiracids, a novel group of polyether toxins, recently identified in shellfish from Ireland, Norway and United Kingdom (James et al., 2000 añadir) and responsible of several outbreaks. AZP symptoms are similar to those of DSP and include nausea, vomiting, severe diarrhoea and stomach cramps. *Protoperidinium crassipes* has been identified as an algal source of AZAs (Yasumoto, unpublished data). Recently, the control of AZAs in shellfish has been regulated in the EU Decision 2002/225/EC that establishes a maximum level of AZAs of 160 µg / kg edible part. In contrast with other lipophilic toxins, such as okadaic acid and analogues that mainly remain within the hepatopancreas, azaspiracids can be accumulated in the whole shellfish tissues. In addition to LC-MS methods, a modification of the Yasumoto mouse bioassay (Yasumoto et al., 1984) that involves the analysis of whole shellfish tissues is suitable for the detection of AZAs in shellfish at the levels established in the Decision (Yasumoto, manuscript in prep.).

24.6.2 Monitoring programmes: putting regulation into practice.

Once established the basis of their regulation, a large number of countries worldwide have established phycotoxin monitoring programmes to prevent risks for public health and minimize economic losses for aquaculture and fisheries. The basic components of a programme -the authorities responsible for its application, the involvement of the industry and the organization of the inspection services- very much depend on the country or geographical area. In many cases the programme includes surveillance for potential toxic algal species (identification and quantification) and monitoring of toxin content in shellfish by means of a range of testing procedures. Results are compared with allowed levels established in the regulations to prevent unsafe shellfish being placed on the market. In addition, some countries complement phytoplankton and toxicity data with the monitoring of biological, chemical and physical parameters such as water temperature, salinity, nutrients, chlorophyll, water stratification, current circulation, etc. This information, together with the weather and oceanographic conditions, constitute valuable prediction tools. Information on water-mass distribution and movements obtained from satellite imagery is also used to predict the appearance of phytoplankton populations. The application of airborne spectrographic sensing technologies and information provided by moored installations of ocean optical equipment have been proposed as effective monitoring tools.

Whatever the features of the programme, an algal and shellfish sampling protocol over time and space is designed, including definition of adequate location and number of sampling sites, and sufficient sampling frequency to document spatio-temporal changes of phytoplankton and toxins in shellfish and to cover the risks of rapid rises in shellfish toxicity. Taking into account the changing nature of phytoplankton populations, sampling should be carried out at least weekly (Andersen, 1996), intensifying during the development of a toxic episode.

The design of the programme is usually done on the basis of oceanographic information, historical data on phytoplankton occurrence in the area, local needs, harvesting periods, the knowledge of the detoxification kinetics of the species under control, etc. Algal and shellfish sampling is usually performed by official authorities,

although in some countries local producers, industry and even volunteers may carry out sampling under the supervision of the authorities.

The economic importance of the resource and therefore the available funding, and also its spatial concentration, usually determines the features and extent of the programme, which may be mostly funded by government, e.g. Galician Rias (north-western Spain); by industry, e.g. Denmark; or by both, e.g. New Zealand. The more information is available on the spatio-temporal evolution of the phytoplankton populations in a given production area, the better the assessment of closure or opening of small zones in a short period. On the contrary, if the costs of regular monitoring are not affordable, production areas may be kept closed for prolonged periods when a risk of toxic episodes exists. In extreme cases of chronic bloom situations and no available funds, production areas may be permanently closed to avert loss of life, as in the case of some shellfish farms in ASEAN regions (Corrales and Maclean, 1995).

In addition to a suitable sampling programme, an adequate transport system for the samples should be developed, including suitable conditions to preserve them until they reach the laboratory. After the identification and quantification of potentially toxic algal species, and after shellfish testing by biological and chemical methods, results are evaluated and delivered to decision-makers. An extremely important issue that determines the efficacy and reliability of the control system is the time between sampling and issuing of results. This should be as short as possible (preferably not longer than one to two days) in order to make decisions on prohibition of harvesting.

Information obtained from monitoring of toxic phytoplankton is used for different goals: as an early warning tool, to set threshold levels for increasing sampling frequency and toxin testing in shellfish, and even as a criterion to close production areas when the number of potentially toxic algal cells exceeds certain critical concentrations. There is no general rule to define harmful concentration of cells and the criteria depend very much on the specific toxic species, ranging from hundreds (*Dinophysis* spp.) to millions (*Pseudo-nitzschia* spp.) of cells. However, correlation between cell counts and toxicity in shellfish is not always good. Significant inter- and intra-species variability in toxin profile and toxin content has been reported for many phytoplankton species even from the same area and over a short period. In addition, some shellfish species can store toxicity for long periods, so that toxicity remains many months after the toxic cells bloomed. ASP toxicity in scallops can remain even years after *Pseudo-nitzschia* blooms. The contribution of cysts to shellfish toxicity also cannot be underestimated.

Some countries rely on both cell counts and shellfish toxin content to make decisions on closure of production areas, while others only take decisions based on toxicity in shellfish. Although information on both phytoplankton and toxin content is highly desirable, shellfish testing is more reliable from the point of view of protecting consumers.

The strategy used to monitor the Galician Rías, an area of intense aquaculture and consequently with most of the resources concentrated in a relatively small area, illustrates how intensive a monitoring programme can be in time and space if the value of the resources is significant. The design of the programme was based on the fact that toxic events are possible at any time of year and that toxicity levels affect only small areas, whereas harvesting closures previously affected wider areas. To better predict the appearance, evolution and disappearance of toxic species, the production areas have been divided into small zones and subzones and the exploited species have been differentiated in terms of intoxication-detoxification dynamics and harvesting

schedules. Depending on factors such as oceanographic and weather conditions and the levels of toxic species found, various action plans including different sampling frequencies (from weekly to daily) have been established (Fig. 24.1). All data generated from the programme – oceanographic variables, phytoplankton composition, weather forecast, surface temperatures, toxin analysis – are processed using the same computer software, which updates the action plan twice a day. Any change in the plan is notified by fax and e-mail to all the organizations of the administration, industry and research centres. The number of sampling sites and frequency of sampling have increased, but the duration of quarantine periods and the extent of affected areas have been reduced considerably, allowing better management of the resources and minimizing economic impacts (Mariño et al., 1998).

A monitoring programme like the Galician one, may be unfeasible, specially from the economical point of view in other areas in which the resources are more dispersed or/and have less economical and social importance. Within the United States, the State of Maine has one of the most comprehensive monitoring programmes for paralytic shellfish poisons (see NSSP, 1990, Part 1, Section C, Appendix A). This programme was necessitated by yearly occurrences of toxic shellfish and has been used as a template for establishing monitoring programmes in many other regions worldwide. Its purpose is to ensure that only safe shellfish are harvested. Years of practical experience have afforded the opportunity to continually modify the sampling programme to better reflect increasing knowledge of potential toxic areas as well as the changing utilization of shellfish. Instead of 'primary-key stations', areas of similar toxic patterns are used. At the beginning of the PSP testing year, shellfish samples are collected from each of these areas to determine the background level of toxicity. Sampling stations from these areas are sampled each week from April to October, regardless of toxin patterns. When shellfish show any toxicity, sampling is expanded until stations of no toxicity are found. This sampling programme allows for closures to be made in a safe manner. Maine's law and regulations require the immediate closure of toxic shellfish harvest areas, and embargo or confiscation of all suspect shellfish. When necessary, licences and certificates may be suspended. Administrative actions are accomplished on a same-day basis.

Maine's PSP Monitoring Program is continually modified to reflect increasing knowledge as to where toxic shellfish are likely to occur, as well as changing utilization of shellfish. The program is carried out on a yearly basis from April until October. Based on areas of similar toxin patterns, the coast of Maine has been divided into 18 areas from south-west to north-east. At the beginning of the PSP testing year, shellfish samples (mussels, *Mytilus edulis*; clams, *Mya arenaria*) are collected weekly from 'primary' sampling stations from these areas. Early-season shellfish samples determine the background level of toxicity in an area (hopefully below the limit of detection sensitivity of the test). Whenever there is any rise of toxin in an area the sampling of shellfish is increased to adjacent sampling stations so that when a closure is necessary adequate data are available to make a proper public-health-oriented decision. Closures are made with safety zones in place and frequently on the basis of previous PSP closures for that area. Shellfish are returned to the laboratory under refrigeration and tested as soon as possible under the standard mouse bioassay. Whenever toxin levels are found approaching the quarantine level of 80 µg STXeq per 100 g of shellfish, the area is closed to shellfish harvesting. Closures are made on a species basis if adequate information is available to demonstrate that not all species are toxic. Species closures require increased sampling of the 'toxin-free' shellfish. In areas where it can be

justified, increased sampling will permit a partial opening of an area where non-toxicity is proven. Shellfish such as the ocean quahog, *Arctica islandica*, are sampled from contract fishing boats by department personnel. Areas where quahogs and similar species cannot be sampled are closed because they cannot be regarded as safe without sampling. Reopening of closed areas is dependent on continued toxin levels less than 80 µg. Openings are made after evaluations of current and historical records. Areas in which there is a high-value shellfish resource and where there is reason to believe that there will not be another rise of toxin may be reopened after at least two weekly samplings below 80 µg.

24.6.3 The need for harmonization.

24.6.3.1 General Agreement on Tariffs and Trade

The World Trade Organization (WTO) emerged as a consequence of historical efforts and negotiations intended to achieve the liberalization of international trade. The WTO includes the General Agreement on Tariffs and Trade (GATT) and comprises about 125 countries that represent more than 90% of international trade. The basic policy of the organization is the progressive elimination of the barriers that protected domestic markets in the past. Within this framework, sanitary standards or regulations may be used as non-tariff barriers. The GATT agreements on sanitary and phytosanitary measures acknowledge the right of WTO members to establish regulations for health protection, if they are based on scientific evidence and risk assessment and do not discriminate among members where identical or similar conditions prevail. Sanitary regulations shall not be applied in a manner that constitutes a disguised restriction to international trade. Thus, when establishing a suitable level of sanitary protection, each country will consider the aim of reducing as much as possible the negative effects on trade so that regulations do not involve a restriction higher than that required (Council Decision 94/800/EC). Based on GATT agreements, trade relationships shall be carried out based on the principles of harmonization, equivalency and transparency. This means the establishment of common sanitary measures following international standards, the acceptance of different sanitary measures whenever the achievement of the appropriate level of protection is demonstrated, and the elaboration of regulations with absolute transparency. WTO members should provide information on their sanitary regulations and notify any change. GATT agreements encourage the uniformity of sanitary regulations in order to eliminate risks to consumers and reduce obstacles to trade. However, when considering existing regulations for marine toxins, discrepancies between methods and limits are evident, even between countries for which a free trade and unrestricted circulation of seafood are already in place. Current attempts at harmonization in the EU, the APEC area and the USA are described below.

24.6.3.2 European approaches to marine toxin control and harmonization

A large number of European coastal countries are affected by toxic events related to harmful algal blooms. Toxic episodes due to PSP have been registered since the 1950s and DSP and ASP toxins have been the cause of prolonged closures of shellfish production areas. On the other hand, a new group of toxins, azaspiracids (AZAs) responsible of the toxic syndrome, Azaspiracid Poisoning (AZP) might affect a number of EU countries. So far, there are no records of shellfish contamination due to the

presence of brevetoxins, but occasional reports have been made of microcystins and nodularin in molluscs that might represent an additional risk for shellfish consumers.

Within Europe, the European Union, currently made up of 15 countries (Austria, Belgium, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Ireland, Italy, Luxembourg, the Netherlands, Portugal, Spain, Sweden and the United Kingdom) is an area of free trade, with unrestricted circulation of merchandises, and with border control carried out only for imports from countries outside the EU. Along the last decade, a number of Directives dealing with food safety legislation have been elaborated and implemented to ensure consumer protection, high quality of products and fair competition.

Regarding molluscan shellfish, the process of harmonization is at an advanced stage. EU Directives 91/492/EEC and 91/493/EEC lay down the health conditions for the production and placing on the market of live bivalves and fishery products respectively. Directive 91/492 establishes the control of the shellfish production areas and the different activities of harvesting, transport, depuration, storage, processing and marketing, as well as microbiological and chemical parameters and marine toxin content. Directive 97/61/EC modifies and complements Directive 91/492/EEC concerning traceability of mollusc batches from harvesting to marketing and includes domoic acid control. According to Directive 91/492/EEC, a public health control system must be established by the responsible authority in order to verify whether the requirements laid down in the Directive are complied with. In relation to marine toxins, this control system must include:

1. Periodic monitoring of live bivalve molluscs and production areas in order to check the possible presence of toxin-producing phytoplankton in the waters and biotoxins in shellfish.
2. Sampling plans that will take into account possible variations in production and relaying areas in the presence of toxic phytoplankton. The sampling must be carried out periodically to detect changes in the composition of the toxic phytoplankton populations and their geographical distribution. Information leading to suspicion of accumulation of toxins in mollusc flesh must be followed by an intensive sampling, increasing the number of sampling points and the number of samples. Toxicity tests shall be carried out using the molluscs of the affected area which are most susceptible to contamination. If the results of a sampling plan show that marketing live bivalve molluscs may constitute a hazard to human health, the responsible authority must close the production area as regards molluscs until the situation has been restored. Marketing molluscs from that area may not be re-authorized until new sampling has provided satisfactory test results.
3. Laboratory tests of the end product to verify that the level of marine biotoxins does not exceed safety limits.
4. Inspection of establishments at regular intervals.
5. Check on storage and transport conditions for consignments of live bivalve molluscs.

Traceability is another important aspect regulated in Directive 97/61/EC. This implies the implementation of a registration and labelling procedure, so that if a health problem occurs after placing shellfish on the market, the batch can be traced back to the dispatching establishment and the harvesting area of origin.

Regarding methods and limits for the control of PSP, DSP and ASP, Directive 91/492/EEC states:

The total PSP content in the edible part of the shellfish must be lower than 80 µg/g/100 g of tissue, measured by a biological testing method that can be associated with a chemical acknowledged method. In the case of discrepancies, the reference method shall be the biological method.

The normal biological testing method must not give positive results to the presence of DSP in the edible part of molluscs.

The total ASP content in the edible part of the shellfish must be lower than 20 µg domoic acid/g by an HPLC method.

The Directive is vague, and neither specific biological methods nor criteria of acceptability have been established for PSP and DSP control. In the case of DSP, the action limit is dependent on the detection limit of the biological method used. Concerning monitoring programmes, the criteria for the design of the sampling plans in relation to the ideal number and location of sampling stations, sampling points, sampling frequency and criteria to close and re-open the areas have not been established. The need to eliminate inconsistencies among EU Member States and harmonize European trade led the European Commission to nominate a National Reference Laboratory on Marine Toxins (EU-NRL) in each Member State and a Community Reference Laboratory (EU-CRL, Vigo, Spain), to co-ordinate the activities of the network of EU-NRLs and create a forum for discussion and agreements on analytical methods, performance criteria, and action levels for toxin control. The tasks of the EU-CRL are 1) to inform NRLs on methods and intercomparative testing, 2) to coordinate the application of methods by organizing intercomparative testing, 3) to coordinate the investigation of methods and inform on advances in the area, 4) to organize training courses, 5) to collaborate with laboratories from third countries 6) to assist the EU Commission in case of discrepancies, and 7) to assist the NRLs on accreditation activities.

The tasks of the NRL are 1) to coordinate the activities of the national laboratories, 2) to assist the competent authority to organize the system for monitoring marine biotoxins, 3) to organize comparative tests between the various national laboratories and disseminate the information supplied by the EU-CRL to the competent authority and national laboratories.

The interaction between the EU-NRLs network takes place through annual meetings, and by means of Working Groups (WGs) hosted by the EU Commission that deals with different marine toxin issues and that are integrated by experts from the network of EU-NRLs and also by experts outside the network that may join the WGs to improve the capabilities. The WGs might deal with items related to the activities of the EU-NRLs, or with specific issues under the request of the EU Commission or the Standing Veterinary Committee. The outcomes of some of the WGs in the way of conclusions and/or recommendations have been used as a pre-normative study to elaborate new regulations. In the last few years, big efforts have been done by the EU-NRL network and the EU Commission to achieve equivalent approaches for the control

of marine toxins in shellfish. For PSP sanitary control, experts of the EU National Reference Laboratories on Marine Toxins agreed that the biological method mentioned in Directive 91/492/EEC should be that described in the AOAC Official Methods of Analysis (1990) and the tolerated level as specified in the Directive. As some recently developed technologies such as the receptor binding assays, some immunoassays (MIST Alert) have shown that they may be suitable alternatives to the mouse assay, it is the intention of the EU-NRLs group to evaluate and assess these methodologies with the goal of open a way to apply them if it is demonstrated that they provide a level of protection equivalent level to that of the mouse bioassay.

Regarding DSP control, Working Group performed a risk assessment on the basis of the available data on OAs PTXs, YTXs and AZP with the goal of recommending allowance levels and suitable detection methods. The recommendations and conclusions of the WG were the scientific basis of the Decision 2002/225/EC establishing limits and methods for the control of OA, DTXs, PTXs YTXs and AZAs that have been already shown in section 24.6.1. Similarly, an intense work was carried out by another WG on ASP in scallops that was the basis of the Decision 2002/226/EC, also discussed in section 24.6.1. The issue of sampling plans has also been addressed by the EU-NRL network, and the conclusions of a WG may be included in the near future in the EU regulations. Other current activities of the EU-NRL network include the preparation and distribution of toxins standards and reference materials, proficiency tests, inter-laboratory studies and validation of analytical methods. In addition to the EU-NRLs activity, it is worth mentioning the work of the European Standardization Committee (CEN), a committee integrated by members of national standardization bodies from 19 european countries and that produces standard methods to enable food manufacturers to determine with reasonable certainty whether a production batch may be put on the market and to enable regulatory authorities to determine whether foodstuffs on the market comply with legal limits. Within CEN, the Working Group 5- covered within Technical Committee 275 (Food analysis-Horizontal Methods)- works on the selection and elaboration of methods that are to become EU standards. CEN standards are not necessarily official EU methods but the EU Commission may make use of them for substances subject to legal limits. The CEN WG 5 works closely with the EU-NRLs network and both are currently elaborating a report on performance criteria for analytical methods for phycotoxins. The criteria will be based on the results of validation studies and published data and will include scope and definitions, tables with precision (RSD_T and RSD_R), recovery experiments for various phycotoxins, information about extraction solvents, applicability and food types.

EU procedure for international seafood trade

In relation to countries outside the EU, Directive 91/492/EEC states that provisions applied to imports of live bivalve molluscs from third countries shall be at least equivalent to those governing the production and placing on the market of Community products. Inspections shall be carried out on the spot by experts from the Commission and the Member States to verify whether the conditions of production and marketing can be considered as being equivalent to those applied in the Community. In deciding on equivalency, particular account shall be taken of legislation of the country, organization of the responsible authority and inspection services, facilities for monitoring the implementation of their legislation, health conditions of production and marketing, monitoring of production areas in relation to microbiological and

environmental contamination and the presence of marine biotoxins, information on toxic phytoplankton, in particular species not occurring in Community waters, and assurances on the compliance with the standards in Directive 91/492/EEC.

EU Decision 97/20/EC of 17 December 1996 establishes a list of countries outside the EU that fulfil the requirements of equivalence concerning production of bivalve molluscs, echinoderms, tunicates and marine gastropods. This decision has undergone modifications in the last few years (Decisions 97/565/EC, 98/571/EC, 2000/332/EC, 2001/38/EC, 2001/255/EC). Imports from the countries listed in the Decision are allowed and, after veterinary control at the border inspection posts, products can enter the Community.

The list of authorized countries could be modified if new agreements of equivalence are signed or if the current agreements are modified. Information about EU legislation currently in force or in preparation is available at the web site:

<http://europa.eu.int>

24.6.3.3 APEC approaches to toxin control and harmonization

A similar programme leading towards harmonization of sanitary controls is being carried out among the countries belonging to the Asia Pacific Economic Cooperation. APEC comprises 18 coastal and archipelago economies with highly diversified marine resources that constitute a significant portion of the regional economic production. Economies belonging to the network are Australia, Brunei, Canada, China, Chinese Taipei, Hong Kong China, Indonesia, Japan, Malaysia, Mexico, New Zealand, Papua New Guinea, the Philippines, the Republic of Korea, Singapore, Thailand and the USA. One of the goals of APEC is to eliminate trade barriers and establish an area of free trade by the year 2020, with unrestricted movement of merchandise, including fish and shellfish products. The occurrence of toxic phytoplankton is a common phenomenon in all the APEC economies, which has affected shellfish resources through impacts on public health and ecosystems. Economic losses have been severe in some countries of this region. Currently, there are great differences in the capabilities of the different APEC economies to cope with toxic algal events, and monitoring programmes differ in geographical coverage, resources monitored, procedures used, toxins analysed and regulatory levels. Some APEC countries have already developed extensive expertise, and are extremely well equipped with analytical instrumentation to cope with phycotoxins, as in the case of Canada, Japan, New Zealand or the USA, while others are still beginning to implement monitoring programmes and have not established regulations to restrict the harvesting or marketing of shellfish contaminated with phycotoxins. As these differences would constitute a serious obstacle for the establishment of a free trade area, a Red Tide/Toxic Algae Project has been set up by the Working Group on Marine Resource Conservation (MRC) in order to achieve common seafood safety standards and legislation (APEC, 1997). The project includes a large-scale regional programme whose main goal is to provide the training, infrastructure and supervision necessary to establish uniformity in policies, procedures and capabilities so that each economy can certify that its seafood is free from phycotoxins, using procedures and standards that are acceptable to all economies within the region. Hence fishery products can be exported and imported freely among the economies. The human resource development and technical exchange is met through focused working groups and task teams, technical workshops, symposia, exchange visits and consultant reports. Within the framework of the project, those countries with greater expertise and

regulatory infrastructure will provide training and technical assistance to other APEC countries lacking the capabilities needed to face toxic events.

The fundamental principle for APEC economies in seafood certification and trade with respect to marine algal toxins is the application of performance-based criteria wherever possible. The current prescriptive analytical methods are considered barriers to trade. This is a fundamental concern of APEC members. There is an urgent need to encourage member economies to develop and accept cost-effective, validated methods for analysis of seafood toxins that can be used for regulation in monitoring programmes without jeopardizing the trade of safe seafood. The equivalency mechanism can be effectively used to measure the performance of different member economy programmes in meeting agreed levels for seafood safety. This approach implies that technical regulations should be designed in such a way that they are performance-based rather than prescriptive in nature. Currently, there is a process for designating APEC Reference Laboratories for Algal Toxin Analysis and Standards to provide advice on analytical methods and standards, promote the development of standard reference materials and assist in the development of a distribution network for standards and reference materials.

A task team on Algal Biotoxin Regulation has proposed that all APEC economies adopt the following action limits:

For PSP toxins: the internationally accepted limit of not more than 80 µg STX equivalent/100 g consumable product

For ASP toxins: the internationally accepted limit of 20 ppm shellfish meat

For NSP toxins: the action limits currently used in the USA, which includes detectable NSP toxin levels in shellfish tissues, as measured by the APHA (1985) method, and *Karenia brevis* concentrations exceeding 5000 cells/L (ISSC, 1997). This is also the cell density that triggers public health warnings in New Zealand, which uses an action limit in shellfish tissues of 20 MU/100 g. In the USA, harvesting areas are reopened when mouse bioassay results indicate that shellfish from closed areas contain <20 MU/100 g.

For DSP toxins: for the present, accept the absence of toxins using bioassays (either rat or mouse) as the limit, subject to change as improvements occur in understanding of the toxins or in the availability of detection methods. Furthermore, the use of alternative detection methods is welcomed, in so far as the economy demonstrates that the performance of the chosen alternative is not less than the performance of the bioassay.

Toxic plankton: it is recommended that economies consider plankton monitoring as a tool that can help make toxicity monitoring more cost effective.

Interactions between APEC and the EU are currently in progress in order to establish equivalent approaches for phycotoxin control and regulations that eliminate obstacles to trade (information on APEC activities from: report of the Program Steering Committee, report of the Task Team on Analytical Methods and Standards and report of the Task Team on Algal Biotoxin Regulations, APEC Marine Resource Conservation Working Group. Project on Management of Red Tides and Harmful Algal Blooms (MRT/HAB), People's Republic of China, April 2000)

24.6.3.4 USA approach to harmonization

Interstate Shellfish Sanitation Conference and National Shellfish Sanitation Program (ISSC/NSSP, USA)

In the United States, the FDA is responsible for assuring that all food items shipped in interstate commerce are safely prepared, packed, and always held under sanitary conditions. Items must be correctly labelled and the conditions in which the food is prepared and held must also be safe and sanitary. In 1925, the FDA was authorized to receive aid from state and local authorities in order to enforce laws to prevent and suppress the transmission of communicable disease. This led to the creation of the National Shellfish Sanitation Program (NSSP). The NSSP includes members of the FDA, state control agencies and the shellfish industry, which set standards to ensure that sanitary conditions exist in the production and interstate shipment of shellfish, on a voluntary basis. The Interstate Shellfish Sanitation Conference (ISSC), formed in 1982, consists of members of state and federal control agencies, the shellfish industry and the academic community. A voluntary organization, it is open to all persons interested in ensuring that shellfish reach the consumer under safe, sanitary conditions. The ISSC provides up-to-date sanitation guidelines for the regulation of harvesting, processing and shipping of shellfish. It also provides a forum for all interested persons to air their concerns regarding shellfish sanitation, and disseminates information on recent developments via publications, meetings and work with academic institutions as well as trade associations. Any country shipping shellfish to the United States must comply with these regulations (Hurst, pers. comm.).

Closure of contaminated areas

An area shall be closed to the harvest of shellfish immediately if the meats of shellfish harvested from that area contain 80 micrograms of Paralytic Shellfish Poison toxins per 100 grams of shellfish meats or contain concentrations of other toxins or contaminants known to be harmful to consumer health. The Commissioner may also close surrounding areas of lower toxicity levels to provide a margin of safety in the event of rapidly changing toxicity levels.

The Commissioner may close areas or fisheries if sufficient current information is not available to assure above conditions do not exist or current information does not permit prediction that the above conditions are unlikely to occur (NSSP, 1990, Chapter 23.30).

Repeal of polluted or contaminated area closures

The Commissioner shall repeal polluted or contaminated area closure regulations when sanitary surveys reveal that pollution or contamination conditions no longer exist and that shellfish may be harvested from the area without threat to the public health (NSSP, 1990, Chapter 23.40).

Toxins other than PSP covered under NSSP Manual requirements, January 1990

The US Department of Marine Resources (DMR) acknowledges that there may be toxins other than PSP in shellfish. The DMR conducts a limited sampling programme

for amnesic shellfish poison (ASP), domoic acid, in conjunction with its PSP sampling programme. Information from Canada concerning domoic acid is available on an up-to-date basis. Closures will be made whenever domoic acid levels reach 20 ppm. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) has not been reported from North America. Due to the presence of *Dinophysis* spp., the DMR recognizes that cases are likely to occur, but it cannot assay for DSP toxins at this time. Any area suspected of containing ASP, DSP or any other toxin defined or undefined will be closed under Chapter 23.30 until such time that area is deemed toxin free.

In order to sell shellfish to EU countries, they must be accompanied by a Health Certificate. The FDA has indicated that these certificates will be issued if the dealer involved is in compliance with applicable laws and regulations. This will involve giving consent for the FDA to access quality control, production and other relevant records. If the dealer is in compliance with NSSP regulations, the EU requirements other than for DSP will be met. DSP may or may not be a problem if the dealer has any records concerning the presence of toxic algae in the harvest waters.

There is at present no test for DSP in the USA. It is recommended that anyone contemplating shipping shellfish to EU countries collected data in their harvest areas on the presence or absence of potentially toxic plankton. It is reasonable to expect the FDA to make the states assume the responsibility of determining any safety standards that is realistically theirs. If and when a dealer asks for certification to the EU market it must be pointed out that there is no way of determining a negative DSP assay.

USA procedure for international seafood trade

Those interested in selling shellfish in the international market should contact their respective National Health agency and their National Natural Resource agency for their current regulations concerning shellfish. In order to market safe shellfish, regulations must be in place and enforced concerning the sanitary suitability of the harvest area(s) and the safe processing of the shellfish. The exporting nation is responsible for determining the safety of shellfish being exported. If the potential shellfish market is the United States, there must be in place a Memorandum of Understanding (MOU) between the national agency responsible for shellfish safety and the FDA. Nations that have current MOUs with the FDA are Australia, Canada, Chile, Iceland, Japan, Mexico, New Zealand, the Republic of Korea and the United Kingdom. The MOUs may restrict harvest areas and selected species of shellfish. Shipments of shellfish to EU Member States must meet the EU sanitation requirements under Council Directive 91/492/EEC), which requires a Certificate of Health by a competent authority from the nation of origin. This certificate must address measures ensuring that the shellfish meet EU standards for shellfish sanitation. Other countries may also require a MOU from the nation of origin concerning safety of shellfish being imported.

REFERENCES

- ANDERSEN, P. 1996. *Design and Implementation of Some Harmful Algal Monitoring Systems*. Paris, UNESCO Publishing. (IOC Technical Series, 44.)
- ANONYMOUS. 1966. *Acid Pre-treatment to Remove Paralytic Poison from Butter Clams* (*Saxidomus giganteus*). US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Bureau of Commercial Fisheries. (Tech. Report, 72.)

- AOAC. 1990. Paralytic shellfish poison. Biological method. Final action. In: K. Herlich (ed.), *Official Methods of Analysis*, 15th ed., sec. 959.08, pp. 881–2. Arlington, Va., Association of Official Analytical Chemists.
- ARAKAWA, O.; NOGUCHI, T.; ONOUE, Y. 1998. Transformation of gonyautoxins in the xanthid crab *Atergatis floridus*. *Fisheries Science* 64, pp. 334–7.
- ARÉVALO, F.F.; BERMÚDEZ, M.; SALGADO, C. 1998. ASP toxicity in scallops: individual variability and tissue distribution. In: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández, T. Wyatt (eds) *Harmful microalgae*. Xunta de Galicia and the IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 499–502.
- APHA. 1985. Method for *Ptychodiscus brevis* toxins. *Laboratory Procedures for the Examination of Seawater and Shellfish*. 5th ed., pp. 64–80. Washington, D.C., American Public Health Association Inc.
- AUNE, T. Risk assessment of toxins associated with DSP, PSP and ASP in seaffod. 2001. In “Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the millenium” De Koe, W., Samsom, R.A., van Egmond H., Gilbert, J. Sabino, M. (eds). ISBN, Wageningen, the Netherlands. pp 515–526.
- BAUDER, A. G.; CEMBELLA, A. D.; BRICELJ, V. M.; QUILLIAM, M. A. 2001. Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, No. 213, pp. 39–52.
- BERENGUER, J. A.; GONZALEZ, L.; JIMENEZ, T. M.; LEGARDA, J. B.; OLMEDO, J. B.; BURDASPAL, P. A. 1993. The effect of commercial processing on the paralytic shellfish poison (PSP) content of naturally-contaminated *Acanthocardia tuberculatum* L. *Food Additives and Contaminants*, No. 10, pp. 217–30.
- BICKNEL, W.J.; COLLINS, J.C. 1973. The paralytic shellfish poisoning incident in Massachusetts. Atlantic City: American Public Health Association centennial meeting, 13 Nov. 1972. Commonwealth. Atlantic City, New Jersey, USA.
- BLOGOSLAWSKI, W. J. 1988. Ozone depuration of bivalves containing PSP: Pitfalls and possibilities. *J. Shellfish Res.*, No. 7, pp. 702–5.
- BLANCO, J.; BERMÚDEZ DE LA PUENTE, M.; ARÉVALO, F.; SALGADO, C.; MOROÑO, A. 2002. Depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) contaminated with domoic acid. *Aquat. Living Resour.* 15, pp. 53–60.
- BLANCO, J.; FERNÁNDEZ, M.; MARIÑO, J.; REGUERA, B.; MÍGUEZ, A.; MANEIRO, J.; CACHO, E.; MARTÍNEZ, A. 1995. From *Dinophysis* spp. toxicity to DSP outbreaks: A preliminary model of toxin accumulation in mussels. In: P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien, C. Marcaillou (eds) *Harmful marine algal blooms*. Lavoisier, Intercept Ltd, Paris, pp. 777–82.
- BLANCO, J.; FERNÁNDEZ, M.L.; MÍGUEZ, A.; MOROÑO, A. 1999. Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental condition. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 176, pp. 153–63.
- BLANCO, J.; MOROÑO, A.; FRANCO, J.; REYERO, M.I. 1997. PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One- and two-compartment models and the effect of some environmental variables. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1158, 165–75.
- BLANCO-PÉREZ, J. 2001. Episodios nocivos por fitoplancton. In: A.N. Maeda-Martínez (ed) *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. Editorial Limusa, México, pp. 285–324

- BLOGOSLAWSKI, W. J.; STEWART, M. E. 1978. Paralytic shellfish poison in *Spisula solidissima*: Anatomical location and ozone detoxification. *Mar. Biol.*, No. 45, pp. 261–4.
- BLOGOSLAWSKI, W.; BROWN, C.; RHODES, E.; BROADHURST, M. 1975. Ozone disinfection of a sea water supply system. In: R. G. Rice and M. E. Browning (eds), *Proc. First Int. Symp. Ozone for Water and Wastewater Treatment*, pp. 674–87. Syracuse, N.Y., International Ozone Institute.
- BLOGOSLAWSKI, W.; NEVE, R. 1979. Detoxification of shellfish. In: D. L. Taylor and H. H. Seliger (eds), *Toxic Dinoflagellate Blooms*, p. 473. New York, Elsevier/North-Holland.
- BLOGOSLAWSKI, W.; STEWART, M. E.; HURST, J. W. JR.; KERN, F. G. III. 1979. Ozone detoxification of paralytic shellfish poison in the softshell clam (*Mya arenaria*). *Toxicon*, No. 17, pp. 650–4.
- BLOGOSLAWSKI, W.; THURBERG, F. P.; DAWSON, M. A. 1973. Ozone inactivation of a *Gymnodinium breve* toxin. *Water Research*, No. 7, pp. 1701–3.
- BOND, R. M.; LACHANCE, A. 1959. *Toxicity Records 1959*. St Andrews, N.B., Canada, Dept. Fish. Fish Insp. Lab.
- BOURNE, N. 1965. Paralytic shellfish poison in sea scallops (*placopecten magellanicus*, Gmelin). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 22, pp. 1137–49.
- BRAVO, I.; FRANCO, J.M.; ALONSO, A.; DIETRICH, R.; MOLIST, P. 2001. Cytological study and immunohistochemical location of PSP toxins in foot skin of the ormer, *Haliotis tuberculata*, from the Galician coast (NW Spain). *Mar. Biol.* 138(4), pp. 709–15.
- BRAVO, I.; REYERO, M.I.; CACHO, E.; FRANCO, J.M. 1999. Paralytic shellfish poisoning in *Haliotis tuberculata* from the Galician coast: geographical distribution, toxicity by lengths and parts of the mollusc. *Aquat. Toxicol.* 46, pp. 79–85.
- BRICELJ, V. M.; LEE, J. H.; CEMBELLA, A. D. 1991. Influence of dinoflagellate cell toxicity on uptake and loss of paralytic shellfish toxins in the northern quahog *Mercenaria mercenaria*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, No. 74, pp. 33–46.
- BRICELJ, V.M. and SHUMWAY, S. 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics and biotransformation. *Reviews in Fisheries Science* 6: 315–383.
- BRICELJ, V.M.; WARD, J.E.; CEMBELLA, A.D.; MACDONALD, B.A. 1998. Application of video-endoscopy to the study of bivalve feeding on toxic dinoflagellates. In: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández, T. Wyatt (eds) *Harmful Microalgae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 453–6.
- BURDASPAL, P.; BUSTOS, J.; LEGARDA, T.; OLMEDO, J.; VIGO, M.; GONZALEZ, L.; BERENGUER, T. 1998. Commercial processing of *Acanthocardia Tuberculatum* naturally contaminated with PSP. Evaluation after one year industrial experience. In: B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernández and T. Wyatt (eds), *Harmful Algae*, pp. 241–4. Proc. 8th Int. Conf. Harmful Algae, Paris, IOC of UNESCO.
- CEMBELLA, A. D.; MILENKOVIC, L.; DOUCETTE, G.; FERNANDEZ, M. L. 1995. *In vitro* biochemical methods and mammalian bioassays for phycotoxins. In: G. M. Hallegraeff, D. M. Anderson, A. D. Cembella and H. O. Enevoldsen (eds), *Manual on Harmful Marine Algae*, pp. 177–228. Paris, UNESCO Publishing. (IOC Manuals and Guides, 33.)

- CEMBELLA, A. D.; TODD, E. 1993. Seafood toxins of algal origin and their control in Canada. In: I. R. Falconer (ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, pp. 129–44. New York, Academic Press.
- CHAMBERS, J. S.; MAGNUSSON, H. W. 1950. Seasonal variations in toxicity of butter clams from selected Alaska beaches. *U.S. Fish. Wild. Spec. Sci. Rep. Fish.*, No. 53, 19 pp.
- CHEBIB, H. A.; CEMBELLA, A. D.; ANDERSON, P. 1993. Differential paralytic shellfish toxin accumulation and detoxification kinetics in transplanted populations of *Mytilus edulis* exposed to natural blooms of *Alexandrium excavatum*. In: T. J. Smayda and Y. Shimizu (eds), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, pp. 383–6. New York, Elsevier Science Inc.
- CORRALES, R.; MACLEAN, J. L. 1995. Impacts of harmful algae on seafarming in the Asia-Pacific areas. *J. Appl. Phycol.*, No. 7, pp. 151–62.
- DAWSON, M. A.; THURBERG, F. P.; BLOGOSLAWSKI, W. J.; SASNER, J. J.; IKAWA, M. 1976. Inactivation of paralytic shellfish poison by ozone treatment. In: G. Ruggieri and H. Webber (eds), *Proc. Fourth Food – Drugs from the Sea Conference*, p. 152. Washington, D.C., Marine Technology Society.
- DESBIENS, M.; CEMBELLA, A. D. 1993. Minimization of PSP toxin accumulation in cultured blue mussels (*Mytilus edulis*) by vertical displacement in the water column. In: T. J. Smayda and Y. Shimizu (eds), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, pp. 395–9. New York, Elsevier Science Inc.
- DOUGLAS, D. J.; KENCHINGTON, E.R.; BIRD, C.J.; POCKLINGTON, R.; BRADFORD, B.; SILVERT, W. 1997. Accumulation of domoic acid by the sea scallop (*Placopecten magellanicus*) fed cultured cells of toxic *Pseudo-nitzschia multiseries*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, pp. 907-913.
- DRAISCI, R.; LUCENTINI, L.; GIANNETTI, L.; BORIA, P.; POLETTI, R. 1997. First report of Pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon*, Vol. 34, No. 8, pp. 923–5.
- DRUM, A.S.; SIEBENS, T.L.; CRECELIUS, E.A.; ELSTON, R.A. 1993. Domoic acid in the Pacific razor clam *Siliqua patula* (Dixon, 1789). *J. Shellfish Res.* 12; pp. 443-50.
- ELBRÄCHTER, M.; SCHNEPF, E. 1998. Parasites of harmful algae. In: D.M. Anderson, A.D. Cembella, & G.M. Hallegraeff (eds.), *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 351-369.
- EUROPEAN COMMISSION. 1992.
- FAO. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, www.fao.org.
- FERNÁNDEZ, M.L.; MÍGUEZ, A.; MOROÑO, A.; CACHO, E.; MARTÍNEZ, A.; BLANCO, J. 1998. Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain. In: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández, T. Wyatt (eds) *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela. Pp. 449-52..
- FLETCHER, G. C.; HAY, B. E.; SCOTT, M. G. 1998. Detoxifying Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) from the neurotoxic shellfish poison (NSP) produced by *Gymnodinium breve*. *J. Shellfish Res.*, No. 17, p. 1637.
- GAARD, E.; POULSON, M. 1988. Blooms of the toxic dinoflagellate *Gonyaulax excavata* in a Faroese fjord. *ICES.C.m.* 1988/L:6:1-11.
- GACUTAN, R. Q.; TABBU, M. Y.; AUJERO, E.; ICATLO, F. JR. 1985. Paralytic shellfish poisoning due to *Pyrodinium bahamense* var. *compressa* in Mati, Davao Oriental, Philippines. *Mar. Biol.*, No. 87, pp. 223–7.

- GACUTAN, R. Q.; TABBU, M. Y.; DE CASTRO, T.; GALLEG0, A. B.; BULALACAO, M. 1984. Detoxification of *Pyrodinium*-generated shellfish poisoning toxin in *Perna viridis* from Western Samar, Philippines. In: A. W. White, M. Anraku and K.-K. Hooi (eds), *Proceedings of a Consultative Meeting Held in Singapore 11–14 September 1984*, pp. 80–5. Southeast Asian Fisheries Development Center and International Development Research Centre.
- GILFILLAN, E. S.; HURST, J. W. JR.; HANSEN, S. A.; LEROYER, C. P. III. 1976. *Final Report to the New England Regional Commission*. USA, New England Regional Commission, 51 pp.
- GILGAN, M.W.; BURNS, B.G.; LANDRY, G.J. 1990. Distribution and magnitude of domoic acid contamination of shellfish in Atlantic Canada during 1988. Elsevier Science Publishing Co., pp. 469-74.
- GONZÁLEZ, J.C.; FONTAL, O.I.; VIEYTES, M.R.; VIEYTES, J.M.; BOTANA, L.M. 2002. Basis for a new procedure to eliminate diarrheic shellfish toxins from a contaminated matrix. *J. Agric. Food Chem.* 50(2), pp. 400-5.
- HAAMER, J.; ANDERSSON, P.O.; LANGE, S.; LL, X.P.; EDEBO, L. 1989. Effects of transplantation and sumping of mussels on their contents of okadaic acid. Abstracts, Fourth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. Lund, Sweden.
- HANNAH, D. J.; TILL, D. G.; DEVERALL, T.; JONES, P. D.; FRY, J. M. 1995. Extraction of lipid-soluble marine biotoxins. *J. AOAC Int.*, No. 78, pp. 480–3.
- HORNER, R. A.; KUSSKE, M.B.; MOYNIHAN, B.P.; SKINNER, R.N.; WEKELL, J.C. 1993. Retention of domoic acid by Pacific razor clams, *Siliqua patula* (Dixon, 1789): Preliminary study. *J. Shellfish Res.* 12, pp. 451-6.
- IIOKA, K.; NAKANO, W.; ISHIMODA, S.; NAGAYAMA, K.; SATO, T. 1964. Studies on toxicity of shellfish (*Chlamys nipponensis* Akazara Kuroda) (II) Change of its toxicity during 1963. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 5, 391-94.
- INDRASANA, W. M.; GILL, T.A. 1999. Thermal degradation of paralytic shellfish poisoning toxins in scallop digestive glands. *Food Res. Internat.* 32, pp. 49-57.
- ISHIDA, H.; NOZAWA, A.; TOTORIBE, K.; MURAMATSU, N.; NUKAYA, H.; TSUJI, K.; KASPAR, H.; YAMAGUCHI, K.; YASUMOTO, T.; BERKETT, N.; KOSUGE, T. 1995. Brevetoxin B1, a new polyether marine toxin from the New Zealand shellfish, *Austrovenus stutchburyi*. *Tetrahedron Lett.*, No. 36, pp. 725–8.
- ISSC. 1997.
- JAMES, K.J., FUREY, A., SATAKE, M., YASUMOTO, T. 2000. Azaspiracids poisoning (AZP) – a new shellfish toxic syndrome in Europe. IXth International Conference on Harmful Algal Blooms. Tasmania.Australia. IN PRESS.
- JONES, T. O.; WHYTE, J.N.C.; TOWNSEND, L.D.; GINTER, N.G.; IWAMA, G.K. 1995. Effects of domoic acid on haemolymph pH, pCO₂, and pO₂ in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* and the California mussel, *Mytilus californianus*. *Aquat. Toxicol.* 31, pp. 43-55.
- KARUNASAGAR, I.; GOWDA, H.S.V.; SUBBURAJ, M.; VENUGOPAL, M.N.; KARUNSAGAR, I. 1984. Outbreak of paralytic shellfish poisoning in Mangalore, West Coast of India. *Curr. Sci.*; 53, 247-49.
- KAT, M. 1983. Diarrhetic mussel poisoning in The Netherlands related to the dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Antonie van Leeuwenhoek*, No. 49, pp. 417–27.
- KIM, H.G. 1998. *Cochlodinium polykrikoides* blooms in Korean coastal waters and their mitigation. In: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández, & T. Wyatt (eds.),

- Harmful algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela. pp. 227-228.
- KODAMA, M.; OGATA, T.; SATO, S.; INOBUCHI, N.; SHIMIZU, M.; DAIDO, H. 1989. Secretion of paralytic shellfish toxins from scallop. *Toxicon*, No. 27, p. 55.
- LASSUS, P.; BARDOUIL, M.; BELIAEFF, B.; MASSELIN, P.; NAVINER, M.; TRUQUET, P. 1999. Effect of a continuous supply of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim on the feeding behavior of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Shellfish Res.* 18, pp. 211-6.
- LEE, J. S.; TANGEN, K.; DAHL, E.; HOVGAAARD, P.; YASUMOTO, T. 1988. Diarrhetic shellfish toxins in Norwegian mussels. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, No. 54, pp. 1953-7.
- LEIRA, F. J.; VIEITES, J.M.; BOTANA, L.M.; VIEYTES, M.R. 1998. Domoic acid levels of naturally contaminated scallops as affected by canning. *J. Food Sci.* 63, pp. 1081-3.
- LEMBEYE, G.; YASUMOTO, T.; ZHAO, J.; FERNANDEZ, R. 1993. DSP outbreak in Chilean fiords. In: D.M. Anderson, A.W. White and D.G. Baden (eds.) *Toxic dinoflagellates*, pp. 525-29. Elsevier Science Publishers, New York.
- LODEIROS, C.J.; RENGEL, J.J.; FREITES, L.; MORALES, F.; HIMMELMAN, J.H. 1998. Growth and survival of the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* maintained in suspended culture at three depths. *Aquaculture* 165, pp. 41-50.
- LUND, J. A. K.; BARNETT, H.J.; HATFIELD, C.L.; GAUGLITZ, J.E.J.; WEKELL, J.C.; RASCO, B. 1997. Domoic acid uptake and depuration in dungeness crab (*Cancer magister* Dana 1852). *J. Shellfish Res.* 16, pp. 225-31.
- MACDONALD, E. M. 1970. The occurrence of paralytic shellfish poison in various species of shore animals along the Strait of Juan de Fuca in the state of Washington. M.S. thesis, Seattle, University of Washington, 65 pp.
- MACFARREN, E. F.; TANABE, H.; SILVA, F. J.; WILSON, W. B.; CAMPBELL, J. E.; LEWIS, K. L. 1965. *Toxicon*, No. 3, pp. 111-23.
- MACKENZIE, A.L.; WHITE, D.A.; SIM, P.G.; HOLLAND, A.J. 1993. Domoic acid and the New Zealand greenshell mussel (*Perna canaliculus*). In: T.J. Smayda, and Y. Shimizu (eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, pp. 395-99. Elsevier Science Publishers, New York.
- MACLEAN, J.L. 1993. Developing-country aquaculture and harmful algal blooms, pp. 252-84. In: R.S.V. Pullin, H. Rosenthal and J.L. Maclean (eds.) *Environment and aquaculture in developing countries*. ICLARM Conf. Proc. 31, 359 p.
- MADENWALD, N. D. 1985. Effect of water temperature on the loss of paralytic shellfish poison from the butter clam, *Saxidomus giganteus*. In: D. M. Anderson, A. W. White and D. G. Baden (eds), *Toxic Dinoflagellates*, pp. 479-84. New York, Elsevier Science Inc.
- MARCAILLOU-LE BAUT, C.; BARDIN, B.; BARDOUIL, M.; BOHEC, M.; LE DEAN, L.; MASSELIN, P.; TRUQUET, P. 1990. Etude de la décontamination de moules toxiques (Toxines diarrhéiques) en laboratoire et en milieu naturel. Rapport IFREMER/DERO-90-02-MR : 21 pp. (France).
- MARCAILLOU-LE BAUT, C.; BARDIN, B.; BARDOUIL, M.; BOHEC, M.; LE DEAN, L.; MASSELIN, P.; TRUQUET, P. 1993. DSP depuration rates of mussels reared in a laboratory and an aquaculture pond. In: T. J. Smayda and Y. Shimizu (eds), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, pp. 531-5. New York, Elsevier Science Inc.
- MARIÑO, J.; MANEIRO, J.; BLANCO, J. 1998. The harmful algae monitoring programme of Galicia: good value for money. In: B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernández and

- T. Wyatt (eds), *Harmful Algae*, pp. 229–32. Proc. 8th Int. Conf. Harmful Algae, Paris, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- MEDCOF, J. C.; LEIM, A. H.; NEEDLER, A. B.; NEEDLER, A. W. H.; GIBBARD, J.; NAUBERT, J. 1947. Paralytic shellfish poisoning on the Canadian Atlantic coast. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.*, No. 75, pp. 1–32.
- MEE, L.D.; ESPINOSA, M.; DIAZ, G. 1996. Paralytic shellfish poisoning with a *Gymnodinium catenatum* red tide on the Pacific coast of Mexico. *Mar. Environ. Res.*, 19, 77–92.
- MOROÑO, A.; ARÉVALO, F.; FERNÁNDEZ, M.L.; MANEIRO, J.; PAZOS, Y.; SALGADO, C.; BLANCO, J. 2002 (In Press). Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* LMK during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*. *Aquat. Toxicol.*
- MOROÑO, A.; FERNÁNDEZ, M.L.; FRANCO, J.M.; MARTÍNEZ, A.; REYERO, I.; MÍGUEZ, A.; CACHO, E.; BLANCO, J. 1998. PSP and DSP detoxification kinetics in mussel, *Mytilus galloprovincialis*: Effect of environmental parameters and body weight. In: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández, T. Wyatt (eds) *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela. pp. 445–8.
- MOROÑO, A.; FRANCO, J.; MIRANDA, M.; REYERO, M.I.; BLANCO, J. 2001. The effect of mussel size, temperature, seston volume, food quality and volume-specific toxin concentration on the uptake rate of PSP toxins by mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 257, pp. 117–32.
- MOROÑO, A.; MANEIRO, J.; PAZOS, Y.; BLANCO, J. 1998. Modelling the accumulation of PSP toxins in galician mussels: results and perspectives. In: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández, T. Wyatt (eds) *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela. Pp. 441–4.
- MORTON, R.A.; BURKLEW, M.A. 1969. Florida shellfish toxicity following blooms of the dinoflagellate *Gymnodinium breve*. *Florida Dept. Nat. Resour. Mar. Res. Lav. Tech. Ser.*, 60, 1–26.
- NAGASHIMA, Y.; NOGUCHI, T.; TANAKA, M.; HASHIMOTO, K. 1991. Thermal degradation of paralytic shellfish poison. *J. Food Science*, No. 56, pp. 1572–5.
- NEAL, R. A. 1967. Fluctuation in level of paralytic shellfish toxin in four species of lamellibranch molluscs near Ketchikan, Alaska, 1963–65. Ph.D. thesis, Seattle, University of Washington, 164 pp.
- NOGUCHI, T.; UEDA, Y.; ONOUE, Y.; KONO, M.; KOYAMA, K.; HASHIMOTO, K.; TAKEUCHI, T.; SENO, Y.; MISHIMA, S. 1980. Reduction in toxicity of highly PSP infested scallops during canning process and storage. *Bull. Jpn. Soc. Sc. Fish.*, No. 46, pp. 1339–44.
- NOVACZEK, I.; MADHYASTHA, M.S.; ABLETT, R.F.; DONALD, A.; JOHNSON, G.; NIJJAR, M.S.; SIMS, D.E. 1992. Depuration of domoic acid from live blue mussels (*Mytilus edulis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, pp. 312–8.
- NSSP. 1990. *National Shellfish Sanitation Program. Manual of Operations. Part I: Sanitation of Shellfish Growing Areas*. 1990 revision. Washington D.C., US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, C22–C24.
- OFUJI, K., SATAKE, M., MCMAHON, T., SILKE, J., JAMES, K.J., NAOKI, H., OSHIMA, Y., YASUMOTO, T. 1999. Two analogues of Azaspiracids isolated from mussels *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Natural toxins* 7: 99–102.

- OSHIMA, Y.; YASUMOTO, T.; KODAMA, M.; OGATA, T. FUKUYO, Y.; MATSUURA, F. 1982. Features of shellfish poisoning in Tohoku district. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 48, pp. 525-30.
- PITCHER, G.C.; FRANCO, J.M.; DOUCETTE, G.J.; POWELL, C.L.; MOUTON, A. 2001. Paralytic shellfish poisoning in the abalone *Haliotis midae* on the west coast of South Africa. *J. Shellfish Res.* 20(2), pp. 895-904.
- POPKISS, M.E.; HORSTMAN, D.A.; HARPUR, D. 1979. Paralytic shellfish poisoning: A report of 17 cases in Cape Town. *S. Afr. Med. J.* 55. pp. 107-1023.
- PRAKASH, A.; MEDCOF, J. C.; TENNANT, A. D. 1971. Paralytic shellfish poisoning in eastern Canada. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.*, No. 177, 87 pp.
- QUAYLE, D. B. 1965. *Animal Detoxification*. Proc. Joint Sanitation Seminar on North Pacific Clams, September 24–25, 1965. 11 pp.
- QUAYLE, D. B. 1969. Paralytic shellfish poisoning in British Columbia, *Bull. Fish. Res. Bd. Can.* 168:68p.
- QUILLIAM, M.A.; GILGAN, M.W.; PLEASANCE, S.; DEFREITAS, A.W.; DOUBLAS, D.; FRITZ, L.; HU, T.; MARR, J.C.; SMYTH, C.; WRIGHT, J.L.C. 1993. Confirmation of an incident of diarrhetic shellfish poisoning in eastern Canada. In: T.J. Smayda and Y. Shimizu (eds.) *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, pp. 547-52. Elsevier Science Publishers, New York.
- SAMPAYO, M.A.; ALVITO, P.; FRANCA, S.; SOUSA, I. 1990. *Dinophysis* spp. toxicity and relation to accompanying species. In: E. Granéli, B. Sundström, L. Edler, D.M.M. Anderson (eds) *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp.215-20.
- SATAKE, M.; OFUJI, K.; JAMES, K.; FUREY, A.; YASUMOTO, T. 1998. New toxic event caused by Irish mussels. In: B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernández and T. Wyatt (eds), *Harmful Algae*, pp. 468–9. Proc. 8th Int. Conf. Harmful Algae, Paris, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- SAUNDERS, S.; SAMPLE, T.; MATSUDA, R. 1982. *Paralytic Shellfish Poisoning: Its History, Processes and Impacts as Applicable to Puget Sound*. Report of Task Group, Seattle, Water Pollution Control Department, 47 p.
- SHARPE, C.A. 1981. Paralytic shellfish poison, California – Summer 1980. In: State of California Dept. Health Services – Sanitary Engineering Section. 75 p. (USA)
- SHUMWAY, S.E. 1990. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *J. World Aq. Soc.*, No. 21, pp. 65–104.
- SHUMWAY, S. E. 1995. Phycotoxin-related shellfish poisoning: bivalve molluscs are not the only vectors. *Rev. Fish. Sc.*, No. 3, pp. 1–1.
- SHUMWAY, S. E.; BARTER, J. L.; SHERMAN-CASWELL, S. 1990. Auditing the impact of toxic algal blooms on oysters. *Environ. Auditor*, No. 2, pp. 41–56.
- SHUMWAY, S. E.; CEMBELLA, A. D. 1993. The impact of toxic algae on scallop culture and fisheries. *Rev. Fish. Sci.*, No. 1, pp. 121–50.
- SHUMWAY, S. E.; CUCCI, T. L. 1987. The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behavior of bivalve molluscs. *Aq. Toxicol.*, No. 10, pp. 9–27.
- SHUMWAY, S. E.; SHERMAN, S. A.; CEMBELLA, A. D.; SELVIN, R. 1994. Accumulation of paralytic shellfish toxins by surfclams, *Spisula solidissima* (Dillwyn, 1897) in the Gulf of Maine: Seasonal changes, distribution between tissues and notes on feeding habits. *Nat. Tox.*, No. 2, pp. 236–51.
- SHUMWAY, S. E.; SHERMAN-CASWELL, S.; HURST, J. W. 1988. Paralytic shellfish poisoning in Maine: monitoring a monster. *J. Shellfish Res.*, No. 7, pp. 643–52.

- SHUMWAY, S. E.; VAN EGMOND, H. P.; HURST, J. W.; BEAN, L. L. 1995. Management of shellfish resources. In: G. M. Hallegraeff, D. M. Anderson and A. D. Cembella (eds), *Manual on Harmful Marine Microalgae*, pp. 433–48. Paris, UNESCO Publishing. (IOC Manuals and Guides, 33.)
- SIEVERS, A. M. 1969. Comparative toxicity of *Gonyaulax monilata* and *Gymnodinium breve* to annelids, crustaceans, mollusks and fish. *J. Protozool.* 16, pp. 401–4.
- SILVERT, W.; SUBBA RAO, D.V. 1991. Dynamic model of the flux of domoic acid, a neurotoxin, through a *Mytilus edulis* population. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, pp. 400–5.
- SILVERT, W. L.; CEMBELLA, A.D. 1995. Dynamic modelling of phycotoxin kinetics in the blue mussel, *Mytilus edulis*, with implications for other marine invertebrates. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, pp. 521–31.
- SOMMER, H.; MEYER, K.F. 1937. Paralytic shellfish poisoning. *Arch. Path.*, 24, pp.560–98.
- SRIBHIBHADH, A. 1963. Seasonal variations of shellfish toxicity in the California mussel, *Mytilus californianus* Conrad, and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), along the Strait of Juan de Fuca and in Willapa Bay. M.S. thesis, Seattle, University of Washington, 171 pp.
- TERAO, K.; ITO, E.; OARADA, M.; MURATA, M.; YASUMOTO, T. 1990. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Pactinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon*, No. 28, pp. 1095–104.
- THURBERG, F. P. 1975. Inactivation of red-tide toxins by ozone treatment. In: W. J. Blogoslawski and R. G. Rice (eds), *Aquatic Application of Ozone*, p. 50. International Ozone Institute.
- TRUSEWICH, B.; SIM, J.; BUSBY, P.; HUGHES, C. 1995. Management of marine toxins in New Zealand. In: T. Yasumoto, Y. Oshima and Y. Fukuyo (eds), *Harmful and Toxic Algal Blooms*, pp. 27–30. Paris, UNESCO Publishing.
- TUBARO, A.; SIDARI, L.; DELLA LOGGIA, R.; YASUMOTO, T. 1998. Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from Northern Adriatic Sea. In: B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernández and T. Wyatt (eds), *Harmful Algae*, pp. 470–2. Proc. 8th Int. Conf. Harmful Algae, Paris, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- VAN APELDOORN, M. E.; VAN EGMOND, H. P.; SPEIJERS, G. J. A. 1999. *Amnesic Shellfish Poisoning: A Review*. National Institute of Public Health and the Environment, the Netherlands, 53 pp. (RIVM Report 388802 019.)
- VAN EGMOND, H. P.; SPEIJERS, G. J. A.; VAN DE TOP, H. J. 1992. Current situation on worldwide regulations for marine phycotoxins. *J. Nat. Tox.*, No. 1, pp. 67–85.
- VIEITES, J. M.; BOTANA, L.M.; VIEYTES, M.R.; LEIRA, F.J. 1999. Canning process that diminishes paralytic shellfish poison in naturally contaminated mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *J. Food Protection* 62, pp. 515–9.
- VIEITES, J. M.; LEIRA, F. 2000. Incidence of marine toxins on industrial activity. In: L. Botana (ed.), *Seafood and Freshwater Toxins*, pp. 741–60. Marcel Dekker, Inc. New York.
- WEKELL, J.C.; GAUGLITZ, E.J.; BARNETT, H.J.; HATFIELD, C.L. 1994. The occurrence of domoic acid in west coast molluscan and crustacean shellfish and finfish during 1991–1993. In: *Proceedings of the 6th International Conference on Toxic Marine Phytoplankton*. Nantes, France. P. Lassus (ed.), in press.

- WHITE, A. W.; MARTIN, J. L.; LEGRESLEY, M.; BLOGOSLAWSKI, W. J. 1985. Inability of ozonation to detoxify shellfish toxins in the soft-shell clams. In: D. M. Anderson, A. W. White and D. G. Baden (eds), *Toxic Dinoflagellates*, pp. 473–8. New York, Elsevier Science Inc.
- WHITE, A. W.; SHUMWAY, S. E.; NASSIF, J.; WHITTAKER, D. K. 1993. Variation in levels of paralytic shellfish toxins among individual shellfish. In: T. J. Smayda and Y. Shimizu (eds), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, pp. 441–6. New York, Elsevier Science Inc.
- WHYTE, J.N.C.; GINTHER, N.G.; TOWNSEND, T.D. 1995. Accumulation and depuration of domoic acid by the mussel, *Mytilus californianus*. In: P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien, C. Marcaillou (eds) *Harmful marine algal blooms*. Technique et documentation-Lavoisier, Intercept Ltd, Paris, pp. 531-7.
- WORTH, G.K. MACLEAN, J.L.; PRICE, M.J. 1975. Paralytic shellfish poisoning in Papua New Ginea, 1972. *Pac Sci.*, 29, pp. 1-5.
- WRIGHT, J. L. C.; BOYD, R. K.; DE FREITAS, A. S. W.; FALK, M.; FOXALL, R. A.; JAMIESON, W. D.; LAYCOCK, M. V.; MCCULLOCH, A. W.; MCINNES, A. G.; ODENSE, P.; PATHAK, V. P.; QUILLIAM, M. A.; RAGON, M. A.; SIM, P. G.; THIBAUT, P.; WALTER, J. A. 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can. J. Chem.*, No. 67, pp. 481–90.
- WRIGHT, J.L.C. ;QUILLIAM, M.A. 1995. Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisons. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. *IOC manual on harmful marine microalgae*. Paris., IOC manuals and guides 33. UNESCO. pp. 97-113.
- YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; YAMAGUCHI, M. (1978). Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, 44, 1249-1255.
- YASUMOTO, T.; MURATA, M. 1990. Polyether toxins involved in seafood poisoning. In: S. Hall and G. Strichartz (eds), *Marine Toxins, Origin, Structure, and Molecular Pharmacology*, pp. 120–32. Washington, D.C., American Chemical Society. (ACS Symposium Series, 418.)
- YASUMOTO, T.; MURATA, M. 1993. Marine toxins. *Chem. Rev.*, No. 93, pp. 1897–909.
- YASUMOTO, T.; MURATA, M.; LEE, J. S.; TORIGOE, K. 1989. Polyether toxins produced by dinoflagellates. In: S. Natori, K. Hashimoto and Y. Ueno (eds), *Mycotoxins and Phycotoxins*, pp. 375–82. New York, Elsevier Science Inc.
- YASUMOTO, T.; MURATA, M.; OSHIMA, Y.; MATSUMOTO, K.; CLARDY, J. 1984. Diarrhetic shellfish poisoning. In: E. P. Ragelis (ed.), *Seafood Toxins*, pp. 207–14. Washington, D.C., American Chemical Society. (ACS Symposium Series, 262.)

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue contribuir a una mejor gestión y mitigación del impacto de las toxinas marinas en la salud pública y en la explotación y comercialización de los moluscos mediante la revisión y valoración de diferentes estrategias, regulaciones e iniciativas desarrolladas en el ámbito comunitario e internacional.

Ha habido numerosos intentos de reducir el impacto de las toxinas marinas en la explotación de los moluscos a partir de diferentes aproximaciones. La adquisición de la capacidad de predicción mediante el control intensivo de las poblaciones fitoplanctónicas, y de las condiciones físico-químicas que condicionan su desarrollo es un paso importante puesto que permite conocer con cierta anticipación el inicio de los episodios tóxicos y predecir su severidad y duración, para de esta manera establecer las estrategias más adecuadas de cara a la protección de los consumidores y del recurso.

La exposición de los moluscos a las microalgas tóxicas puede ser en principio reducida mediante dos tipos de procedimientos: 1) actuando sobre la proliferación algal para conseguir su eliminación (dispersión de arcilla, uso de ultrasonidos, cloración, virus, bacterias, parásitos, etc) ó 2) ubicando los moluscos en zonas de baja concentración de fitoplancton tóxico. La revisión de las iniciativas llevadas a cabo para la eliminación de las poblaciones de fitoplancton muestra que la mayor parte de ellas han sido únicamente ensayadas a nivel experimental, con la excepción de la utilización de arcilla, que si bien resultó eficaz para alcanzar el objetivo perseguido, conlleva un considerable impacto ambiental

El conocimiento de los mecanismos de intoxicación y depuración es valioso a efectos de la planificación de las actividades acuícolas. Tanto la capacidad de acumulación de toxinas como la tasa de depuración dependen del grupo de toxinas pero también de la especie de molusco, de manera que es posible seleccionar aquellas especies que acumulen niveles bajos de toxinas y que presenten unas tasas de depuración más elevada. En lo que respecta a los factores ambientales que regulan la depuración, parece que la cantidad de alimento disponible es el más relevante, aumentado ligeramente la tasa de depuración. El sitio de almacenamiento de las toxinas en los moluscos influye también en dicha tasa, de manera que las toxinas ligadas a las glándulas digestivas se eliminan en general más rápidamente que las toxinas ligadas a otros tejidos.

En lo que respecta a la eliminación de las toxinas una vez que ya han sido incorporadas a los moluscos existen dos estrategias principales. La primera está dirigida a los

moluscos vivos e incluye técnicas tales como la inducción de estrés con variaciones de temperatura ó salinidad, el tratamiento con cloro ó ozono y la transferencia de los moluscos a zonas libres de toxinas y con condiciones ambientales que favorezcan la depuración. La eliminación de toxinas a gran escala mediante el uso de ozono o en sistemas artificiales no parece prometedora desde el punto de vista de su viabilidad económica. La transferencia de los moluscos a áreas libres de fitoplancton tóxico es el método más obvio, si bien el pequeño efecto de las condiciones ambientales en la depuración de las toxinas DSP hace que este sistema sea más efectivo a efectos de prevenir una mayor contaminación de los moluscos que en lo que se refiere a aumentar su tasa de depuración.

La segunda estrategia está dirigida a la obtención de productos marinos libres de toxinas y comprende sistemas tales como la eliminación de las partes tóxicas de los moluscos mediante la evisceración selectiva o la aplicación de técnicas más complejas de procesamiento industrial. La evisceración resulta más viable en el caso de aquellas especies con un tamaño suficientemente grande que permita la disección de las partes tóxicas y cuyo valor comercial compense o justifique los costes de dicha disección. Este procedimiento se aplica en la UE para la detoxificación de vieiras (*Pecten maximus*) contaminadas con ácido domoico (ASP) bajo condiciones estrictamente reguladas en la legislación. En lo que respecta al procesamiento industrial, se han ensayado con diferente éxito diversas técnicas de congelación y preparación, incluyendo la elaboración de conservas bajo condiciones específicas dirigidas a la eliminación de las toxinas. Aunque existen algunas excepciones, como es el caso del procesamiento para la elaboración de conserva de *Acanthocardia tuberculata* que elimina de manera considerable la toxicidad PSP, la mayor parte de las técnicas de procesamiento han resultado inviables desde el punto de vista económico ó han dado lugar a productos no aceptables por su textura o sabor.

Dado que una vez que los moluscos son contaminados, las estrategias de mitigación son limitadas, la mayor parte de los países han desarrollado programas de monitorización y control del fitoplancton tóxico en las aguas de producción y de las toxinas en los moluscos. En lo que respecta al control de las toxinas, las estrategias encaminadas a minimizar el riesgo para la salud pública se basan en el establecimiento de los niveles máximos permitidos y en la determinación de los niveles de toxinas en los moluscos mediante la aplicación de métodos de ensayo ó análisis.

En relación a la definición de los niveles máximos, el análisis de riesgo es la metodología fundamental para ello e incluye las siguientes etapas: 1) identificación del tóxico 2) caracterización y evaluación de los efectos adversos para la salud asociados a las toxinas 3) valoración de la exposición al mismo a través de la evaluación de la ingesta más probable y 4)

caracterización del riesgo mediante la estimación cuantitativa de la probabilidad de ocurrencia de efectos adversos en una población dada. Este procedimiento requiere la disponibilidad de datos epidemiológicos, la realización de estudios sobre la cinética y los mecanismos de acción de las toxinas, la identificación de los órganos diana y la realización de estudios de la relación dosis- respuesta. La capacidad de los procedimientos de identificación y cuantificación de toxinas debe también ser tomada en cuenta a efectos de su regulación.

En el caso de algunas familias de toxinas marinas, y especialmente en el caso de las toxinas DSP, los estudios mencionados anteriormente son muy limitados, de manera que los límites han sido establecidos en base a los escasos datos epidemiológicos derivados de las intoxicaciones registradas en humanos, sobre la base de los límites de detección de los métodos disponibles o bien siguiendo las regulaciones de otros países. Los estudios toxicológicos han estado limitados por la escasez de toxinas puras en suficiente cantidad lo que también ha dificultado el desarrollo y validación de métodos adecuados de determinación.

A pesar de estas limitaciones, un gran número de países han establecido límites y regulaciones para el control de las toxinas en los moluscos, y específicamente para las toxinas PSP, DSP, ASP, NSP y Azaspirácidos. Los aspectos cubiertos por los programas de monitorización y control dependen mucho del país y área geográfica considerada. En la mayor parte de los casos los programas incluyen la vigilancia de la presencia de especies fitoplanctónicas potencialmente tóxicas (identificación y cuantificación) y la determinación del contenido en toxinas de los moluscos. Adicionalmente algunos países o regiones complementan estos datos con la monitorización de parámetros físicos, químicos y biológicos (temperatura del agua, salinidad, nutrientes, clorofila, corrientes, estratificación de la columna de agua, etc) y con el conocimiento de las condiciones oceanográficas y meteorológicas. Algunos de estos programas han recibido el status de regulaciones oficiales, estableciendo los requisitos para las áreas de producción y para la comercialización, así como los métodos y los límites para el control sanitario.

La revisión de las regulaciones pone de manifiesto la existencia de discrepancias en métodos y límites. Las disparidades son especialmente relevantes en las áreas geográficas en las que existe libre movimiento de mercancías y servicios. La falta de uniformidad, y en algunos casos, la carencia de regulaciones puede dar lugar a riesgos para la salud pública y a competencia desleal.

En lo que respecta a las regulaciones relativas al control de las toxinas históricamente incluidas en el grupo DSP, han sido objeto de gran controversia, existiendo discrepancias en lo que se refiere a qué toxinas deben ser incluidas dentro de esta clasificación y cuáles deben

ser objeto de monitorización y control, así como en lo que respecta a los niveles máximos admisibles y a los métodos más adecuados para su detección y cuantificación. Todo esto ha ocasionado discrepancias en los métodos de detección y cuantificación utilizados y en los criterios de positividad. Ha existido un consenso general en la pertinencia de clasificar el ácido okadaico y derivados dentro del grupo de toxinas DSP, por sus documentados efectos diarreicos, pero ha existido un debate en la comunidad científica en lo que se refiere a la idoneidad de la inclusión de las pectenotoxinas y yesotoxinas en este grupo y en lo que respecta al riesgo que representan para la salud humana y por tanto a la necesidad o no de regulación de las mismas.

A pesar de las dificultades y de las carencias y limitaciones de los datos disponibles, en los últimos años se han realizado esfuerzos considerables para racionalizar y mejorar la legislación sanitaria relativa a estas familias de toxinas, llevándose a cabo iniciativas de armonización en diferentes marcos y ámbitos (Red Europea de Laboratorios Nacionales de Referencia de Toxinas Marinas, Red de países pertenecientes a la Cooperación económica Asia Pacífico, APEC, etc) que dieron lugar primeramente a cambios significativos en la legislación europea y posteriormente a una nueva propuesta de niveles y criterios de aceptabilidad de métodos que muy posiblemente dará lugar a nuevas modificaciones a nivel comunitario e internacional.

CONCLUSIONES

Sobre estrategias de gestión y mitigación

La adquisición de la capacidad de predicción mediante el control intensivo de las poblaciones fitoplanctónicas, y de las condiciones físico-químicas que condicionan su desarrollo es un paso importante para establecer las estrategias más adecuadas de cara a la protección de los consumidores y del recurso.

El conocimiento de los mecanismos de intoxicación y depuración es valioso a efectos de la planificación de las actividades acuícolas pues permite predecir la duración de los episodios tóxicos a la vez que seleccionar aquellas especies que acumulen niveles bajos de toxinas y que presenten unas tasas de depuración más elevada.

Una vez que los moluscos están contaminados, su transferencia a zonas libres de fitoplancton tóxico y con condiciones ambientales que aumenten la tasa de depuración parece hoy por hoy la estrategia de mitigación más efectiva para favorecer la eliminación de las toxinas.

En el caso de moluscos destinados a la elaboración, la evisceración y ciertos métodos específicos de procesado se han perfilado como las estrategias más viables para la eliminación de ciertas toxinas (ASP y PSP) en algunas especies de moluscos, si bien no han sido desarrolladas o implantadas hasta la fecha para la eliminación de las toxinas DSP.

Es importante avanzar en la optimización de los sistemas de control para reducir sus costes y para reducir los tiempos de cierre de las áreas que sean ocasionados por limitaciones de los mismos.

Sobre el análisis de las regulaciones y de los sistemas de control de las toxinas

La mayor parte de los países han implantado la legislación que regula los programas de control de toxinas y fitoplancton tóxico. Dependiendo del país y área geográfica dichos programas pueden incluir la monitorización de variables oceanográficas (viento, corrientes, nutrientes), las especies de microalgas tóxicas y el contenido en toxinas de los moluscos.

La revisión de las regulaciones pone de manifiesto la existencia de discrepancias especialmente relevantes en las áreas geográficas en las que existe libre movimiento de mercancías y servicios. En lo que respecta a las regulaciones relativas al control de las toxinas DSP, han existido discrepancias en lo que se refiere a qué toxinas deben ser incluidas dentro de esta clasificación y cuáles deben ser objeto de monitorización y control, así como en lo que

respecta a los niveles máximos admisibles y a los métodos más adecuados para su detección y cuantificación

Los estudios toxicológicos son escasos y limitados por la escasez de toxinas puras, los datos sobre exposición e ingesta son también escasos o imprecisos. La falta de toxinas puras y material certificado de referencia ha dificultado igualmente el desarrollo y validación de métodos adecuados de determinación.

Es necesario avanzar en la obtención de datos epidemiológicos, toxicológicos y de ingesta que permitan un establecimiento de niveles máximos sobre una base científica sólida.

Es necesario avanzar en la armonización de las regulaciones para evitar que distintos niveles de restricción puedan repercutir en la salud pública y en el mercado.

En los últimos años se han realizado esfuerzos considerables para racionalizar y mejorar la legislación sanitaria relativa a estas familias de toxinas, llevándose a cabo iniciativas de armonización en diferentes marcos y ámbitos que dieron lugar primeramente a cambios significativos en la legislación europea y posteriormente a una nueva propuesta de niveles y criterios de aceptabilidad de métodos que muy posiblemente dará lugar a nuevas modificaciones a nivel comunitario e internacional.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

Sobre las especies productoras, los perfiles y el contenido en toxinas de las mismas (CAPÍTULOS I y III).

El perfil de toxinas de *Dinophysis acuminata* está compuesto mayoritariamente por AO. Es posible que una parte importante del AO se encuentre en las células en forma de diol ésteres o de compuestos tipo DTX4 / DTX5.

El perfil de toxinas de *Dinophysis acuta* está compuesto por PTX2, AO y DTX2, esta última toxina siempre presente en menor cantidad que el AO. Al igual que en el caso de *D. acuminata*, existen indicios sólidos de que una parte importante del AO y de la DTX2 se encuentren en las células en forma de diol ésteres o de compuestos tipo DTX4 /DTX5.

El perfil de toxinas de *D. caudata* está dominado por PTX2, observándose concentraciones de toxina por célula muy elevadas (del orden de 100 pg cel⁻¹).

Se observa una gran variabilidad temporal y espacial inter e intraespecífica en el contenido de toxina por célula.

Las toxinas principales que contienen las diferentes cepas de *Prorocentrum lima* son AO, DTX1 y DTX2. AO y DTX2 aparecen en forma libre y esterificada mientras que DTX1 lo hace en forma libre. Existe una notable heterogeneidad en el contenido y perfil de toxinas de las diferentes cepas.

Sobre los perfiles de toxinas en el fitoplancton y el mejillón y sobre el origen de las intoxicaciones (CAPÍTULOS I y II).

D. acuminata, *D. acuta* y *D. caudata* son los principales agentes que contribuyen a la toxicidad DSP de los moluscos de las Rías Gallegas.

No hay indicios de que *P.lima* contribuya a los episodios de toxicidad DSP en los moluscos de las Rías Gallegas.

Los episodios de *D. acuminata* dan lugar a perfiles tóxicos en mejillón en los que el AO es la toxina predominante, mientras que la presencia de *D. acuta* da lugar a perfiles más complejos, en los que además de AO y DTX2 se observan cantidades importantes de PTX2SA.

Es presumible que la presencia de *D. caudata*, organismo productor de PTX2, en el plancton contribuya también a la aparición de PTX2SA en mejillones.

Los derivados de baja polaridad forman parte del perfil de toxinas DSP de los mejillones si bien siempre en menor proporción que las correspondientes toxinas principales (AO y DTX2).

Sobre la acumulación, transformación y eliminación de las toxinas en el mejillón (CAPÍTULOS I y II).

El AO y la DTX2 se encuentran, al menos en parte, en forma de derivados sulfatados o diol ésteres en las células de los dinoflagelados. Los mejillones ingieren y asimilan estas toxinas del fitoplancton, siendo las formas conjugadas rápidamente hidrolizadas a AO y DTX2 por acción de las esterasas presentes en las glándulas digestivas o por aquéllas liberadas por las células planctónicas. Simultáneamente se produce una lenta acilación del AO y la DTX2.

La PTX2 es convertida mayoritariamente en el correspondientes secoácido una vez que es ingerida y asimilada por el mejillón.

La tasa de depuración depende de las toxinas. El AO se elimina más rápidamente que la DTX2 y a su vez las toxinas principales (AO y DTX2) se eliminan más rápidamente que los derivados de baja polaridad correspondientes.

La tasa de depuración se incrementa con la concentración de fitoplancton, si bien el efecto registrado fue pequeño. La temperatura y la salinidad no inciden de manera relevante en la depuración.

No se encuentra una clara compartimentalización de las toxinas dentro de la glándula digestiva.

Sobre los bioensayos (CAPÍTULO III).

Hasta muy recientemente, los bioensayos en ratón han sido los únicos métodos reconocidos para la determinación de toxinas PSP, DSP y NSP con fines de control sanitario y han demostrado su eficacia en la protección de la salud pública.

La baja especificidad de los bioensayos ha sido de gran utilidad desde el punto de vista de la estimación del riesgo, puesto que detectan un amplio rango de toxinas y permiten la detección de nuevas toxinas o congéneres, proporcionando de esta forma un alto grado de protección al consumidor.

En los últimos años, la presión para reducir o eliminar el uso de animales de experimentación junto con el desarrollo de métodos alternativos ha dado lugar a modificaciones en la legislación de manera que se ha abierto la posibilidad de utilizar métodos alternativos a los bioensayos con animales siempre que sean sometidos a procesos previos de validación y que se demuestre que proporcionan un nivel de protección equivalente al proporcionado por los bioensayos.

Es previsible que en un futuro próximo los bioensayos dejen de ser utilizados como herramientas rutinarias de análisis con fines de control sanitario, si bien es importante que permanezcan como herramientas de investigación para la detección de nuevos compuestos o nuevos grupos de toxinas.

Mientras tanto, es importante seguir realizando esfuerzos orientados a la validación e intercalibración de los bioensayos utilizados en la actualidad para el control de toxinas DSP.

Sobre estrategias de gestión y mitigación (CAPÍTULO IV).

La adquisición de la capacidad de predicción mediante el control intensivo de las poblaciones fitoplanctónicas, y de las condiciones físico-químicas que condicionan su desarrollo es un paso importante para establecer las estrategias más adecuadas de cara a la protección de los consumidores y del recurso.

El conocimiento de los mecanismos de intoxicación y depuración es valioso a efectos de la planificación de las actividades acuícolas pues permite predecir la duración de los episodios tóxicos a la vez que seleccionar aquellas especies que acumulen niveles bajos de toxinas y que presenten unas tasas de depuración más elevada.

Una vez que los moluscos están contaminados, su transferencia a zonas libres de fitoplancton tóxico y con condiciones ambientales que aumenten la tasa de depuración parece hoy por hoy la estrategia de mitigación más efectiva para favorecer la eliminación de las toxinas.

En el caso de moluscos destinados a la elaboración, la evisceración y ciertos métodos específicos de procesado se han perfilado como las estrategias más viables para la eliminación

de ciertas toxinas (ASP y PSP) en algunas especies de moluscos, si bien no han sido desarrolladas o implantadas hasta la fecha para la eliminación de las toxinas DSP.

Es importante avanzar en la optimización de los sistemas de control para reducir sus costes y para reducir los tiempos de cierre de las áreas que sean ocasionados por limitaciones de los mismos.

Sobre el análisis de las regulaciones y de los sistemas de control de las toxinas (CAPÍTULO IV).

La mayor parte de los países han implantado la legislación que regula los programas de control de toxinas y fitoplancton tóxico. Dependiendo del país y área geográfica dichos programas pueden incluir la monitorización de variables oceanográficas (viento, corrientes, nutrientes), las especies de microalgas tóxicas y el contenido en toxinas de los moluscos.

La revisión de las regulaciones pone de manifiesto la existencia de discrepancias especialmente relevantes en las áreas geográficas en las que existe libre movimiento de mercancías y servicios. En lo que respecta a las regulaciones relativas al control de las toxinas DSP, han existido discrepancias en lo que se refiere a qué toxinas deben ser incluidas dentro de esta clasificación y cuáles deben ser objeto de monitorización y control, así como en lo que respecta a los niveles máximos admisibles y a los métodos más adecuados para su detección y cuantificación.

Los estudios toxicológicos son escasos y limitados por la escasez de toxinas puras, los datos sobre exposición e ingesta son también escasos o imprecisos. La falta de toxinas puras y material certificado de referencia ha dificultado igualmente el desarrollo y validación de métodos adecuados de determinación.

Es necesario avanzar en la obtención de datos epidemiológicos, toxicológicos y de ingesta que permitan un establecimiento de niveles máximos sobre una base científica sólida.

Es necesario avanzar en la armonización de las regulaciones para evitar que distintos niveles de restricción puedan repercutir en la salud pública y en el mercado.

En los últimos años se han realizado esfuerzos considerables para racionalizar y mejorar la legislación sanitaria relativa a estas familias de toxinas, llevándose a cabo iniciativas de armonización en diferentes marcos y ámbitos que dieron lugar primeramente a cambios significativos en la legislación europea y posteriormente a una nueva propuesta de niveles y criterios de aceptabilidad de métodos que muy posiblemente dará lugar a nuevas modificaciones a nivel comunitario e internacional.

PERSPECTIVAS

Los trabajos que constituyen esta tesis doctoral han contribuido a avanzar en el conocimiento sobre las especies de dinoflagelados y sobre las toxinas causantes de los episodios de toxicidad DSP en los moluscos de las Rías Gallegas y a mejorar el conocimiento sobre los mecanismos de acumulación, transformación y eliminación de las mismas por parte de los moluscos.

Se ha desvelado una notable complejidad en los perfiles de toxinas, tanto en lo que se refiere a los dinoflagelados, que presentan notables variaciones intraespecíficas, como en lo que respecta a los moluscos, que contribuyen a esta complejidad a través de una complicada cinética de transformación y eliminación de las toxinas. Esto da lugar a importantes desafíos tanto en el terreno analítico, de cara a conseguir determinar con exactitud los perfiles originales de las células y de los moluscos, como en el terreno de las regulaciones sanitarias que deben ser capaces de abordar esta complejidad de manera segura y eficaz desde el punto de vista de la protección de la salud pública pero sin producir trabas innecesarias a la explotación y comercialización de los moluscos. Para ello es importante seguir trabajando hacia una correcta y armonizada regulación de los niveles tolerables, a partir de la obtención de datos epidemiológicos, toxicológicos y de ingesta y hacia el desarrollo de sistemas de control efectivos y optimizados en términos de coste económico.

Desde el punto de vista de la predicción, a la vista de los conocimientos actuales, puede considerarse realista la implementación de modelos predictivos de la acumulación de toxinas en bivalvos que permitan estimar la duración de los episodios tóxicos y por tanto optimizar las frecuencias de muestreo del sistema de control.

En lo que se refiere a la mitigación, es importante incidir en el desarrollo de métodos y estrategias de reducción de la acumulación de toxinas en los bivalvos, bien actuando sobre los procesos que regulan la acumulación y depuración (aproximación fisiológica) como sobre los propios organismos (aproximación genética). Por ello, se hace necesario encontrar las bases fisiológicas de las que depende la depuración de las toxinas y diseñar tratamientos específicos enfocados a modificar los procesos más relevantes para la eliminación.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

Alfonso, A., de la Rosa, L., Vieytes, M. R., Yasumoto, T. and Botana, L.M. (2003). Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes. *Biochemical Pharmacology*, 65: 193-208.

Amzil, Z., Pouchus, Y. F., Le Boterf, J., Roussakis, C., Verbist, J. F., Marcaillou-LeBaut, C., and Masselin, P. (1992). Short-time cytotoxicity of mussel extracts: a new bioassay for okadaic acid detection. *Toxicon*, 30:1419-1425.

Amzil, Z., Quilliam, M.A., Hu, T. and Wright, J.L.C. (1999). Winter accumulation of Paralytic Shellfish Toxins in digestive glands of mussels from Arcachon and Toulon (France) without detectable toxic plankton species revealed by interference in the mouse bioassay for lipophilic toxins. *Natural Toxins*, 7: 271-277.

Andersen, P., Hald, B. and Emsholm, H. (1996). Toxicity of *Dinophysis acuminata* in Danish coastal waters. In: T. Yasumoto, Y. Oshima, and Y. Fukuyo (eds). *Harmful and Toxic Algal Blooms*, IOC of UNESCO, Paris, pp. 281-4.

Anonymous (2002). Decisión de la Comisión 2002/225/CE de 15 de Marzo de 2002, por la que se establecen normas detalladas para la aplicación de la Directiva 91/492/CEE del Consejo. *Off. J. Eur. Communities* L75: 62-64.

Anonymous (2004). Reglamento CE No 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de Abril de 2004, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. *Off. J. Eur. Communities*. L226: 3-21.

Anonymous (2004). Reglamento CE No 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de Abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. *Off. J. Eur. Communities*. L226: 22-82.

Anonymous (2004). Reglamento CE No 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de Abril de 2004 por el que se establecen las normas específicas para la organización de los controles oficiales para los productos de origen animal destinados al consumo humano. *Off. J. Eur. Communities*. L226: 83-127.

Arévalo, F., Pazos, Y., Correa, J., Salgado, C., Moroño, A., Paz, B. and Franco, J. (2006). First reported case of yessotoxins in mussels in the Galician Rías during a bloom of *Lingulodinium polyedrum* STEIN (Dodge). In: Henshilwood, K., Deegan, B., McMahon, T., Cusack, C., Keaveney, S., Silke, J., O' Cinneide, M., Lyons, D. and Hess, P. (eds). *Molluscan Shellfish Safety*. The Marine Institute, Rinville, Oranmore, Galway, Ireland

Aune, T., Yasumoto, T. and Engeland, E. (1991). Light and electron microscopic studies on effects of marine algal toxins freshly prepared hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health*, 34: 1-9.

Aune, T. (2001). Risk assessment of toxins associated with DSP, PSP and ASP in seafood. In: "Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the millenium". *Proceedings of the Xth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*. W.K. de Joe, R.A.

Samson, H.P. van Egmond, J.Gilbert and M. Sabino (eds.). Wageningen, the Netherlands, pp. 515-526.

Aune, T., Torgersen, T., Arff, J. and Tangen, K. (2002). Detection of pectenotoxin in Norwegian blue mussels. Abstracts of the Xth International Conference on Harmful Algae, Florida, USA, p. 17.

Aune, T., Sorby, R., Yasumoto, T., Ramstad, H. and Landsverk, T. (2002). Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin toward mice. *Toxicon*, 40: 77-82.

Bauder, A.G., Cembella, A.D., Bricelj, V.M. and Quilliam, M.A. (2001). Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 213: 39-52.

Bauder, A., Cembella, A.D., Quilliam, M.A. and Ross, N. (1996). Kinetics of diarrhetic shellfish toxins in the bay scallop, *Argopecten irradians*. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, pp. 104-107.

Berven, G., Sætre, F., Halvorsen, K. and Seglen, P.O. (2001). Effects of the diarrhetic shellfish toxin, okadaic acid, on cytoskeletal elements, viability and functionality of rat liver and intestinal cells. *Toxicon*, 39: 349-62.

Bialojan, C. and Takai, A. (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.*, 256: 283-90.

Blanco, J., Fernández, M., Mariño, J., Reguera, B., Míguez, A., Maneiro, J., Cacho, E. and Martínez, A. (1995). From *Dinophysis* spp. toxicity to DSP outbreaks: A preliminary model of toxin accumulation in mussels. In: P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien and C. Marcaillou (eds.). *Harmful Marine Algal Blooms*, Lavoisier, Intercept Ltd, Paris, pp. 777-82.

Blanco, J., Morono, A., Franco, J. and Reyero, M.I. (1997). PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One- and two-compartment models and the effect of some environmental variables. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 158: 165-75.

Blanco, J., Fernández, M.L., Míguez, A. and Morono, A. (1999). Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 176: 153-63.

Blanco, J., Acosta, C.P., Bermúdez de la Puente, M. and Salgado, C. (2002a). Depuration and anatomical distribution of the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin domoic acid in the king scallop *Pecten maximus*. *Aquatic Toxicology*, 60: 111-21.

Blanco, J., Bermúdez de la Puente, M., Arévalo, F., Salgado, C. and Morono, A. (2002b). Depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) contaminated with domoic acid. *Aquat. Living Resour.*, 15: 53-60.

Bravo, I. (1991). Results of preliminary studies in the field and in culture of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. *Revue Internationale d'Océanographie Medicale*, 189-196.

Bravo, I., Ramilo, I., Franco, J.M., Maroño, E., Fraga, S., (1997). Colección de cultivos de microalgas nocivas del Centro Oceanográfico de Vigo. Resultados experimentales de algunas especies. Inf. Tec. Inst. Esp. Oceanogr., 168, 32 pp.

Bravo, I., Fernández, M.L., Ramilo, I. and Marínez, A. (2001). Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain). Toxicon, 39: 1537-45.

Burgess, V. and Shaw, G. (2001). Pectenotoxins - an issue for public health - A review of their comparative toxicology and metabolism. Environment International, 27: 275-83.

Campos, M.J., Fraga, S., Mariño, J. and Sanchez, F.J. (1982). Red tide monitoring program on NW Spain. Report of 1977-1981. International Council for the Exploration of the Sea. C.M. 1982/L:27, 8 pp.

Carmody, E.P., James, K.J., Kelly, S.S. and Thomas, K. (1995a). Complex diarrhetic shellfish toxin profiles in Irish mussels. In: P., Lassus, G., Arzul, E., Erard, P., Gentien and C. Marcaillou (eds.). Harmful Marine Algal Blooms, Lavoisier, Intercept Ltd, Paris, pp. 273-8.

Carmody, E.P., James, K.J. and Kelly, S.S. (1995b). Diarrhetic shellfish poisoning: evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays methods for dinophysistoxin-2 determination. J. AOAC Int., 78: 1403-8.

Chen, D.Z.X., Boland, M.P., Smillie, M.A., Klix, H., Ptak, K., Anderson, R.J. and Holmes, C.F.B. (1993). Identification of protein-phosphatase inhibitors of the microcystin class in the marine environment. Toxicon, 31: 1407-1414.

Chin, J.D., Quilliam, M.A., Fremy, J.M., Mohatrapa, S.K. and Sikorska, H.M. (1995). Screening for okadaic acid by immunoassay. J. AOAC, Int., 78: 508-13.

Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R., Satake, M., Viviani, R. and Yasumoto, T. (1997). Yessotoxin in mussels of the Northern Adriatic Sea. Toxicon, 35: 177-83.

Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R. and Viviani, R. (1998). Isolation of adriatoxin, a new analogue of yessotoxin, from mussels of the Adriatic Sea. Tetrahedron Lett., 39: 8897-900.

Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R. and Viviani, R. (1999). Isolation of 45-hydroxyessotoxin from mussels of the Adriatic Sea. Toxicon, 37: 689-93.

Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Poletti, R., Viviani, R. (2000) A new analogue of yessotoxin, carboxyessotoxin, isolated from Adriatic Sea mussels. Eur. J. Org. Chem. 2000: 291-295.

Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein-phosphatases. Annual Review in Biochemistry, 58: 453-508.

Cohen, P., Holmes, C.F. and Tsukitani, Y. (1990). Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. Trends Biochem. Sci., 15: 98-102.

Cordier, S., Monfort, C., Miossec, L., Richardson, S. and Belin, C. (2000). Ecological analysis of digestive cancer mortality related to contamination by diarrhetic shellfish poisoning toxins along the coasts of France. *Environmental Research*, 84: 145-50.

Croci, L., Toti, L., De Medici, D. and Cozzi, L. (1994). Diarrhetic shellfish poison in mussels: comparison of methods of detection and determination of the effectiveness of depuration. *Int. J. Food Microbiol.*, 24: 337-42.

Dahl, E. and Yndestad, M. (1985). Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in Norway in the autumn 1984 related to the occurrence of *Dinophysis* spp. In: D.M. Anderson, A.D. Cembella and G.M. Hallegraeff (eds). *Physiological ecology of harmful algal blooms*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 495-500.

Dahl, E., Rogstad, A., Aune, T., Hormazabal, V. and Underdal, B. (1995). Toxicity of mussels related to occurrence of *Dinophysis* species. In: P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien and C. Marcaillou (eds.). *Harmful Marine Algal Blooms*, Lavoisier, Intercept Ltd, Paris, pp. 783-8.

Daiguji, M., Satake, M., James, K.J., Bishops, A., MacKenzie, L., Naoki, H. and Yasumoto, T. (1998). Structures of new pectenotoxin analogs, pectenotoxin-2 seco acid and 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid, isolated from a dinoflagellate and greenshell mussels. *Chem Lett. Chem Soc Jpn.*, pp. 653-4.

Desbiens, M. and Cembella, A. (1993). Growth of the blue mussel *Mytilus edulis* on toxic *Alexandrium fundyense* and effects of gut passage on dinoflagellate cells. In: T.J. Smayda and Y. Shimizu (eds). *Toxic phytoplankton blooms in the sea*, Elsevier Science, New York, USA, pp. 395-9.

Dickey, R.W., Granade, H.R. and Bencsath, F.A. (1993). Improved analytical methodology for the derivatization and HPLC -fluorometric determination of okadaic acid in phytoplankton and shellfish. In: T.J. Smayda and Y. Shimizu (eds). *Toxic phytoplankton blooms in the sea*, Elsevier Science, New York, USA, pp. 495-9.

Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria, P. and Poletti, R. (1996). First report of pectenotoxin-2 (PTX2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon*, 34: 923-935.

Draisci, R., Giannetti, L., Lucentini, L., Marchiafava, C., James, K.J., Bishop, A.G., Healy, B.M. and Kelly, S.S. (1998a). Isolation of a new okadaic acid analogue from phytoplankton implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Journal of Chromatography A*, 798: 137-45.

Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria, P., James, K.J., Furey, A., Gillman, M., Kelly, S. (1998b). Determination of diarrhetic shellfish toxins in mussels by microliquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, 81: 441-447.

Draisci, R., Palleschi, L., Giannetti, L., Lucentini, L., James, K.J., Bishop, A.G., Satake, M. and Yasumoto, T. (1999). New approach to the direct detection of known and new diarrhoeic shellfish toxins in mussels and phytoplankton by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 847: 213-21.

Draisici, R., Palleschi, L., Ferretti, E., Furey, A., James, K.J., Satake, M. and Yasumoto, T. (2000). Development of a method for the identification of azaspiracid in shellfish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 871: 13-21.

Espenes, A., Aasen, J., Satake, M., Smith, A., Eraker, N., Aune, T. (2004). Toxicity of yessotoxin towards mice upon repeated oral exposure. 5th International Conference on Molluscan Shellfish Safety. Galway. Ireland 2004. Book of Abstracts, p. 31.

Fernández, M.L., Míguez, A., Cacho, E. and Martínez, A. (1996). Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. *Toxicon*, 34: 381-7.

Fernández, M.L., Míguez, A., Moroño, A., Cacho, E., Martínez, A. and Blanco, J. (1998). Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain. In: B., Reguera, J., Blanco, M.L., Fernández and T. Wyatt (eds). *Harmful Algae*, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 449-52.

Fernández, M.L., Reguera, B., Ramilo, I. and Martínez, A. (2001). Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from the Galician Rías Baixas. In: G.M. Hallegraeff, S.I. Blackburn, C.J. Bolch and R.J. Lewis (eds). *Harmful Algal Blooms 2000*, IOC of UNESCO, pp. 360-3.

Fernández, M.L., Míguez, A., Martínez, A., Moroño, A., Arévalo, F., Pazos, Y., Salgado, C., Correa, J., Blanco, J., González-Gil, S. and Reguera, B. (2003a). First report of pectenotoxin-2 in phytoplankton net-hauls and mussels from the Galician Rías Baixas (NW Spain) during proliferations of *Dinophysis acuta* and *Dinophysis caudata*. In A. Villalba, B. Reguera, J.L. Romalde and R. Beiras (eds). *Molluscan Shellfish Safety*, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, pp. 75-83.

Fernández, M.L., Richard, D.J.A. and Cembella, A. D. (2003b). *In vivo* assays for phycotoxins. In: Hallegraeff, G.M., Cembella, A.D. and Anderson, D.M., (eds.). *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Paris. UNESCO Publishing. pp. 347-380.

Fernández, M.L., Shumway, S. and Blanco, J. (2003c). Management of shellfish resources. In: Hallegraeff, G.M., Cembella, A.D. and Anderson, D.M., (eds.). *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Paris. UNESCO Publishing. pp. 657-692.

Fernández, M.L., Reguera, B., Gonzalez-Gil, S. and Míguez, A. (2006). Pectenotoxin 2 in single cells isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rias (NW Spain). *Toxicon*, 48: 477-490.

Fessard, V., J. Diogene, A. Dubreuil, J.P: Quod, M. Durand Clement, C. Legay and S. Puiseaux-Dao. (1994). Selection of cytotoxic responses to maitotoxin and okadaic acid and evaluation of toxicity of dinoflagellate extracts. *Natural Toxins*, 2: 322-328.

Fladmark, K.E., Serres, M.H., Larsen, N.L., Yasumoto, T., Aune, T. and Døskeland, S.O. (1998). Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes. *Toxicon*, 36: 1101-14.

Fujiki, H., Suganuma, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Takagi, K., Uda, N., Wakamatsu, K., Yamanda, K., Murata, M., Yasumoto, T. and Sugimura, T. (1988). Diarrhetic shellfish toxins, dinophysistoxin-1 is a potent tumor promoter on mouse skin. *Jpn. J. Cancer Res.*, 79: 1089-93.

Gago, A., de la Fuente, E., Rodriguez, J.A., Alvito, P. and Sousa, I. (1993). Okadaic acid as the main component of diarrhetic shellfish toxins in molluscs from the west coast of Spain and Portugal. In: T.J. Smayda and Y. Shimizu (eds). *Toxic phytoplankton blooms in the sea*, Elsevier Science, New York, USA, pp. 537-40.

Gago-Martínez, A., Rodríguez-Vázquez, J.A., Thibault, P., and Quilliam, M.A. (1996). Simultaneous occurrence of diarrhetic and paralytic shellfish poisoning toxins in Spanish mussels in 1993. *Nat. Toxins*, 4 (2): 72-79.

González, J.C., Fontal, O.I., Vieytes, M.R., Vieytes, J.M. and Botana, L.M. (2002). Basis for a new procedure to eliminate diarrhetic shellfish toxins from a contaminated matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 400-5.

Haamer, J., Anderson, P.-O., Lindahl, O., Lange, S., Li X. P. and Edebo, L. (1990). Effects of transplantation and reinmersion of mussels *Mytilus edulis Linnaeus* 1728, on their contents in okadaic acid. *J. Shellfish Res.*, 9: 109-12.

Hess, P., McMahon, T., Slattery, D., Swords, D., Dowling, G., McCarron, M., Clarke, D., Gibbons, W., Silke, W. and O' Cinneide, M. (2003). Use of LC-MS testing to identify lipophilic toxins, to establish local trends and interspecies differences and to test the comparability of LC-MS testing with mouse bioassay an example from the Irish Biotoxin Monitoring Programme. In: A. Villalba, B. Reguera, J.L. Romalde and R. Beiras (eds). *Molluscan Shellfish Safety*, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, pp. 57-66.

Holmes, C.F.B. (1991). Liquid chromatography-linked protein phosphatase bioassay; a highly sensitive marine bioscreen for okadaic acid and related diarrhetic shellfish toxins. *Toxicon*, 29: 469-77.

Honkanen, R.E., Mowdy, D.E., Dickey, R.W. (1996). Detection of DSP toxins, okadaic acid, and dinophysistoxin-1 in shellfish by serine / threonine protein phosphatase assay. *J. AOAC Int.*, 79(6): 1336-1343.

Horner, R.A., Kusske, M.B., Moynihan, B.P., Skinner, R.N. and Wekell, J.C. (1993). Retention of domoic acid by Pacific razor clams, *Siliqua patula* (Dixon, 1789): preliminary study. *J. Shellfish Res.*, 12: 451-6.

Hu, T, Marr, J. (1992 a). New diol esters isolated from cultures of the dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*. *Journal of Natural Products*, 55(11): 1631-1637.

Hu, T., Doyle, J., Jackson, D., Marr, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, J.L.C. (1992 b). Isolation of a new Diarrhetic Shellfish Poison from Irish mussels. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 54: 39-41.

- Hu, T., de Freitas, A.S.W., Doyle, J., Jackson, D., Marr, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Walter, J.A. and Wright, J.L.C. (1993). New DSP toxin derivatives isolated from toxic mussels and the dinoflagellates, *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*. In: T.J. Smayda and Y. Shimizu (eds). Toxic phytoplankton blooms in the sea, Elsevier Science, New York, USA, pp. 507-12.
- Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., MacLachlan, J.L., Wright, J.L.C. (1995 a). Two new water-soluble DSP toxin derivatives from the dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: Possible storage and excretion products. Tetrahedron letters, 36 (51): 9273-9276.
- Hu, T., Curtis, J.M., Walter J.A., Wright, L.C. (1995 b). Identification of DTX-4, a New Water-soluble Phosphatase Inhibitor from the Toxic Dinoflagellate *Prorocentrum lima*. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1995: 597-599.
- Hu, T., Burton, I., Curtis, J.M., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Windust, A.J. and Wright, J.L.C. (1999). Oxidative transformation of a naturally occurring okadaic acid diol ester by the diatom *Thalassiosira weissflogi*. Tetrahedron Letters, 40: 3981-4.
- Ito, S. and Tsukada, K. (2001). Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins. J. Chromatogr. A, 943: 30-46.
- Ito, E. (2006). Verification of diarrhetic activities of PTX-2 and okadaic acid *in vivo*. Programme and abstracts of 12th International Conference on Harmful Algae, Copenhagen, Denmark, 4-8 September 2006
- James, K.J., Bishop, A.G., Gillman, M., Kelly, S.S., Roden, C., Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L. and Boria, P. (1997). Liquid chromatography with fluorometric mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection for the investigation of the seafood-toxin-producing phytoplankton, *Dinophysis acuta*. J. Chromatography A, 777: 213-21.
- James, K.J., Bishop, A.G., Gillman, M., Kelly, S.S., Roden, C., Draisci, R., Lucentini, L. and Giannetti, L. (1998 a). The diarrhoeic shellfish poisoning toxins of *Dinophysis acuta*: identification and isolation of dinophysistoxin-2 (DTX-2). In: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández and T. Wyatt (eds). Harmful Algae, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 489-92.
- James, K.J., Furey, A., Healy, B., Kelly, S. S., Twohig, M. (1998 b). Luminarin-3, a new fluorimetric reagent for the HPLC determination of diarrhoeic shellfish poisoning toxins. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T. (eds). Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO. Santiago de Compostela, pp. 519-520.
- James, K.J., Bishop A.G., Healy, B.M., Roden, C., Sherlock, I.R., Twohig, M., Draisci, R., Giannetti, L., Lucentini, L. (1999a). Efficient isolation of the rare diarrhoeic shellfish toxin, dinophysistoxin-2, from marine phytoplankton. Toxicon, 37(2): 343-357.
- James, K.J., Bishop, A.G., Draisci, R., Palleschi, L., Marchiafava, C., Ferretti, E., Satake, M. and Yasumoto, T. (1999b). Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish. Journal of Chromatography A, 844: 53-65.

Johansen, M. and Rundberget, T. (2006). 12th Internacional Conference on Harmful Algae, Copenhagen, 4-8 September 2006, Programme and Abstracts, p.41.

Johansson, N., Graneli, E., Yasumoto, T., Carlsson, P. and Legrand, C. (1996). Toxin production by *Dinophysis acuminata* and *D. acuta* cells grown under nutrient sufficient and deficient conditions. In: T. Yasumoto, Y. Oshima, and Y. Fukuyo (eds). Harmful and Toxic Algal Blooms, IOC of UNESCO, Paris, pp. 277-80.

Kat, M. (1979). The occurrence of *Prorocentrum* species and coincidental gastrointestinal illness of mussel consumers. In: D.L. Taylor and H.W. Seliger (eds). Elsevier, New York, pp. 215-20.

Kat, M. (1983). *Dinophysis acuminata* blooms in the Dutch coastal area related to diarrhetic mussel poisoning in the Dutch Waddensea. Sarsia, 6: 81-4.

Kim, H.G. (1998). *Cochlodinium polykrikoides* blooms in Korean coastal waters and their mitigation. In: B., Reguera, J., Blanco, M.L., Fernández and T. Wyatt (eds). Harmful Algae, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 227-8.

Kitts, D.D., Smith, D.S., Beitler, M.K. and Liston, J. (1992). Presence of Paralytic shellfish poisoning toxins and soluble proteins in toxic butter clams (*Saxidomus giganteus*). Biochem. Biophys. Res. Comm., 184: 511-7.

Krogh, P., L. Edler, E. Granéli and U. Nyman (1985). Outbreak of Diarrhetic Shellfish Poisoning on the west coast of Sweden. In: Anderson, D.M., White, A.W. & Baden, D.G. (eds.). Toxic Dinoflagellates. Elsevier, New York, pp. 501-504.

Kumagai, M., Yanagi, T., Murata, M., Yasumoto, T., Kat, M., Lassus, P., Rodriguez-Vazquez, J.A., (1986). Okadaic acid as the Causative Toxin of Diarrhetic Shellfish Poisoning in Europe. Agric. Biol. Chem., 50: 2853-7.

Landsberg, J.H., Balazs, G.H., Steidinger, K.A., Baden, D.G., Work, T.M. and Russell, D.J. (1999). The potential role of natural tumor promoters in marine turtle fibropapillomatosis. Journal of Aquatic Animal Health, 11: 199-210.

Lawrence, J.E., Bauder, A.G., Quilliam, M.A. and Cembella, A.D. (1998). *Prorocentrum lima*: a putative link to diarrhetic shellfish poisoning in Nova Scotia, Canada. Harmful Algae, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp.78-9.

Lawrence, J.E., Grant, J., Quilliam, M.A., Bauder, A.G., Cembella, A.D. (2000). Colonization and growth of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and associated fouling macroalgae on mussels in suspended culture. Mar. Ecol. Progr. Ser., 201: 147-154.

Laycock, M.V., Jellett, J.F., Easy, E.J., Donovan, M.A. (2006). First report of a new rapid assay for diarrhetic shellfish poisoning toxins. Harmful Algae, 5: 74-78.

Lee, J-S., Yanagi, T., Kenna, R., Yasumoto, T., (1987). Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. Agric. Biol. Chem., 51: 877-81.

- Lee, J.-S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P. and Yasumoto, T. (1989 a). Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *Jour. Appl. Phycol.*, 1:147-52.
- Lee, J.S., Murata, M. and Yasumoto, T. (1989 b). Analytical methods for the determination of diarrhetic shellfish toxins. In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. (eds). *Mycotoxins and Phycotoxins* 88. Tokyo. Elsevier Science, pp 327-334.
- Leira, F., Cabado, A.G., Vieytes, M.R., Román, Y., Alfonso, A., Botana, L.M., Yasumoto, T., Malaguti, C. and Rossini, G.P. (2002). Characterization of f-actin depolymerization as a major toxic event induced by pectenotoxin-6 in neuroblastoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 63: 1979-88.
- Levine, L., Fujiki H., Yamada K., Ojika M., Gjika H.B. and Van Vanakis H. (1988). Production of antibodies and development of a radioimmunoassay for okadaic acid. *Toxicon*, 26: 1123-8.
- Lodeiros, C.J., Rengel, J.J. and Freitas, L. (1998). Growth and survival of the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* maintained in suspended culture at three depths. *Aquaculture*, 165 (1-2): 41-50.
- Luckas, B. (1992). Phycotoxins in seafood - toxicological and chromatographic aspects. *J. Chromatogr.*, 624: 439-56.
- Masselin, P., Lassus, P., and Bardouil, M. (1992). High performance liquid chromatography analysis of diarrhetic toxins in *Dinophysis* spp. from the French coast. *J. Appl. Phycol.*, 4:385-389.
- MacKenzie, A., White, D.A., Sim, P.G. and Holland, A.J. (1993). Domoic acid and the New Zealand Greenshell mussel (*Perna canaliculus*). In: T.J. Smayda and Y. Shimizu (eds). *Toxic phytoplankton blooms in the sea*, Elsevier Science, New York, USA, pp. 607-12.
- MacKenzie, L., Truman, P., Satake, M., Yasumoto, T., Adamson, J., Mountfort, D. and White, D. (1998). Dinoflagellate blooms and associated DSP toxicity in shellfish in New Zealand. In: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández and T. Wyatt (eds). *Harmful Algae*, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 74-7.
- Mackenzie, L., Suzuki, T. and Adamson, J. (2001). Elimination and differential transformation of Yessotoxin by the greenshell mussel *Perna canaliculus* and the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J. and Lewis, R.J., (eds.) *Harmful Algal Blooms 2000*, Paris: IOC of UNESCO, pp. 371-374.
- MacKenzie, L., Holland, P., McNabb, P., Beuzenberg, V., Selwood, A. and Suzuki, T. (2002). Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon*, 40: 1321-30.
- Marcaillou-Le-Baut, C., Bardin, B., Bardouil, M., Bohec, M., Le Dean, L., Masselin, P. and Truquet, P. (1993). DSP depuration rates of mussels reared in a laboratory and an aquaculture

pond. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (eds). Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, New York, pp. 531-535.

Marr, J.C., Jackson, A.E., McLachlan J.L. (1992). Occurrence of *Prorocentrum lima*, a DSP toxin-producing species from the Atlantic coast of Canada. J. Appl. Phycol., 4: 17-24.

Marr, J.C., McDowell, L.M., Quilliam, M.A. (1994). Investigation of derivatization reagents for the analysis of DSP toxins by liquid chromatography with fluorescence detection. Nat. Toxins, 2: 302-311.

Morton, S.L., Bomber, J.W. and Tindall, P.M. (1994). Environmental effects on the production of okadaic acid from *Prorocentrum hoffmannianum* Faust I. temperature, light, and salinity. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 178: 67-77.

McNabb, P. and Holland, P. (2003). Using liquid chromatography mass spectrometry to manage shellfish harvesting and protect public health. In: Proceedings of the 4th Internacional Conference on Molluscan Shellfish Safety. Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J., Beiras, R. (eds). Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of Unesco, pp. 179-186.

Miles, C.O., Wilkins, A.L., Munday, R., Dines, M.H., Hawkes, A.D., Briggs, L.R., Sandvik, M., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Holland, P.T., Quilliam, M.A., MacKenzie, A.L., Beuzenberg, V. and Towers, N.R. (2004 a). Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assesment of their acute toxicities. Toxicon, 43: 1-9.

Miles, C.O., Sandvik, M., Petersen, D., Quilliam, M.A., Naustvoll, L.J., Rundberget, T., Torgersen, T., Hovgaard, P., Jensen, D.J., Samdal, I.A., Cooney, J.M. (2004 b). A novel pectenotoxin, PTX-12, in *Dinophysis* spp. and shellfish from Norway. Toxicon, 17: 1423-1433.

Miles, C.O., Wilkins, A.L., Hawkes, A.D., Jensen, D.J., Selwood, A.I., Beuzenberg, V., MacKenzie, A.L., Cooney, J.M. and Holland, P.T. (2006). Isolation and identification of pectenotoxins-13 and -14 from *Dinophysis acuta* in New Zealand. Toxicon, 48: 152-159.

Moroño, A., Fernández, M.L., Franco, J.M., Martínez, A., Reyero, I., Míguez, A., Cacho, E. and Blanco, J. (1998). PSP and DSP detoxification kinetics in mussel, *Mytilus galloprovincialis*: Effect of environmental parameters and body weight. In: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández and T. Wyatt (eds). Harmful Algae, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 445-8.

Moroño, A., Arévalo, F., Fernández, M.L., Maneiro, J., Pazos, Y., Salgado, C. and Blanco, J. (2003). Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*. Aquatic Toxicology, 62: 269-80.

Mounfort, D. O., Kennedy, G., Garthwaite, I., Quilliam, M., Truman, P. and Hannah, D. (1999). Evaluation of the phosphatase inhibition assay in the determination of okadaic acid in mussels. Toxicon, 37: 909-22.

- Mounfort, D.O., Suzuki, T. and Truman, P. (2001). Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP-contaminated mussels. *Toxicon*, 39: 383-90.
- Murata, M., Shimitani, M., Sugitani, H., Oshima, Y. and Yasumoto, T. (1982). Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 48: 549-52.
- Murata, M., Kumagai, M., Lee, J.S. and Yasumoto, T. (1987). Isolation and structure of Yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Letters*, 28: 5869-72.
- Murata, M. and Yasumoto, T. (1990). Polyether toxins implicated in ciguatera and seafood poisoning. *Microb. Toxins Foods Feeds: Cell. Mol. Modes Action, Meeting 1988*, Plenum, New York, pp 589-96.
- Norte, M., Padilla, A., Fernandez, J.J. and Souto, M.L. (1994). Structural Determination and Biosynthetic Origin of Two Ester Derivatives of Okadaic Acid Isolated From *Prorocentrum lima*. *Tetrahedron* 50(30): 9175-9180.
- Novacek, I., Madhyastha, M.S., Ablett, R.F., Johnson, G., Nijjar, M.S. and Sims, D.E. (1991). Uptake, disposition and depuration of domoic acid by blue mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat. Toxicol.*, 21: 103-18.
- Novacek, I., Madhyastha, M.S., Ablett, R.F., Donald, A., Johnson, G., Nijjar, M.S. and Sims, D.E. (1992). Depuration of domoic acid from live blue mussels (*Mytilus edulis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49: 312-8.
- Ofuji, M., Satake, M., Oshima, Y., McMahon, T., James, K.J. and Yasumoto, T. (1999b). A sensitive and specific determination method for azaspiracids by liquid chromatography mass spectrometry. *Nat. Tox.*, 7: 247-50.
- Ogino, H., Kumagai M. and Yasumoto, T. (1997). Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Natural Toxins*, 5: 255-259.
- Oshima, Y., Blackburn, S. and Hallegraeff, G. (1993). Comparative study on paralytic shellfish toxins profiles of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from three different countries. *Mar. Biol.*, 116: 471-476.
- Park, M.G., Kim, S., Kim, H.S., Myung, G., Kang, Y.G. and Yih, W. (2006). First successful culture of the marine dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Aquatic Microbial Ecology*, 45: 101-106.
- Pillet, S., Pereira, A., Braekman, J. C. and Houvenaghel, G. (1995). Patterns in long term accumulation of okadaic acid and DTX-1 in blue mussels, *Mytilus edulis*, experimentally fed with the DSP-containing alga *Prorocentrum lima*. In: P., Lassus, G., Arzul, E., Erard, P. Gentien and C. Marcaillou (eds.). *Harmful Marine Algal Blooms*, Lavoisier, Intercept Ltd, Paris, pp. 487-92.
- Pleasance, S., Quilliam, M.A., de Freitas, A.S.W., Marr, J.C. and Cembella, A.D. (1990). Ion-spray mass spectrometry of marine toxins. II. Analysis of diarrhetic shellfish toxins in

plankton by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 4: 206-213.

Pleasance, S., Quilliam, M.A., Marr, J.C. (1992). Ion-spray mass spectrometry of marine toxins. IV. Determination of diarrhetic shellfish poisoning toxins in mussel tissue by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 6: 121-127.

Quilliam, M.A., Gilgan, M.W., Pleasance, S., Defreitas, A.S.W., Douglas, D., Fritz, L., Hu, T., Marr, J.C., Smyth, C. and Wright, J.L.C., (1993). Confirmation of an incident of Diarrhetic Shellfish Poisoning in eastern Canada. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (eds). *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Elsevier, New York, pp. 547-552.

Quilliam, M. A. (1995). Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *J. AOAC. International*, 78: 555-70.

Quilliam, M.A., Hardstaff, W.R., Ishida, N., McLachlan, J.L., Reeves, A.R., Rose, N.W. and Windust, A.J. (1996). Production of Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (eds). *Harmful and Toxic Algal Blooms*, IOC of UNESCO, Sendai, pp. 289-292.

Quilliam, M.A., Gago-Martínez, A. and Rodríguez-Vázquez, J.A. (1998). Improved method for preparation and use of 9-anthryldiazomethane for derivatization of hydroxycarboxylic acids. Application to diarrhetic shellfish poisoning toxins. *Journal of Chromatography, A* 807 (2): 229-239.

Quilliam, M., Eaglesham, G., Hallegraeff, G., Quaine, J., Richard, D. and Nunez, P. (2000) Detection and identification of toxins associated with a shellfish poisoning incident in New South Wales, Australia. In: *Proc. 9th Int. Conf. Harmful Algal Blooms*, (abstract), p.48.

Ramstad, H., Larsen, S. and Aune, T. (2001a). The repeatability of two HPLC methods and the PP2A assay in the quantification of diarrhetic toxins in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon*, 39: 515-522.

Ramstad, H., Shen, J.L., Larsen, S. and Aune, T. (2001b). The validity of two HPLC methods and a colorimetric PP2A assay related to the mouse bioassay in quantification of diarrhetic toxins in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon*, 39: 1387-1391.

Reguera, B., Bravo, I., Mariño, J., Campos, M.J., Fraga, S., and Carbonell, A. (1993). Trends in the occurrence of *Dinophysis* spp in Galician coastal waters. In: Smayda T.J., and Shimizu Y. (eds.). *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 559-564.

Rodríguez Vázquez, J.A., Gago, A., Oshima, Y., Sugino, K., Lee, J.S. and Yasumoto, T. (1989). Analyses of toxins in mussels from the Atlantic coast of Spain. In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. (eds). *Mycotoxins and Phycotoxins* 88. Elsevier, Amsterdam, pp. 367-375.

- Rosa de la, L., Alfonso, A., Vilariño, N., Vieytes, M. and Botana, L.M. (2001). Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin. *Biochem. Pharmacol.*, 61: 827-833.
- Sampayo, M.A., Alvito, P., Franca, S. and Sousa, I. (1990). *Dinophysis* spp. toxicity and relation to accompanying species. In: E. Granéli, B. Sundström, L. Edler, and D.M. Anderson (eds.). *Toxic Marine Phytoplankton*, Elsevier, New York, pp. 215-20.
- Sasaki, K., Wright, J.L.C. and Yasumoto, T. (1998). The identification and characterization of pectenotoxins PTX4 and PTX7 as spiroketal stereoisomers of two previously reported pectenotoxins. *J. Org. Chem.*, 63: 2475-80.
- Sasaki, K., Takizawa, A., Tubaro, A., Sidari, L., Della Loggia, R. and Yasumoto, T. (1999). Fluorometric analysis of pectenotoxin-2 in microalgal samples by high performance liquid chromatography. *Nat. Toxins*, 7: 241-6.
- Satake, M., Terasawa, K., Kadowaki, Y and Yasumoto, Y. (1996). Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogues from toxic scallops. *Tet. Lett.*, 37, pp. 5955-8.
- Satake, M., Tubaro, A., Lee, J.-S. and Yasumoto, Y. (1997). Two new analogues of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea. *Nat. Tox.*, 5: 107-10.
- Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K.J., Furey, A., McMahon, T., Silke, J. and Yasumoto, T. (1998). Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*, *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 9967-8.
- Satake, M., Ichimura, T., Sekiguchi, K., Yoshimatsu S. and Oshima, Y. (1999). Confirmation of Yessotoxin and 45, 46, 47-Trinoryessotoxin Production by *Protoceratium reticulatum* collected in Japan. *Nat. Toxins*, 7: 147-50.
- Sato, S., Koike, K. and Kodama, M. (1996). Seasonal variation of okadaic acid and dinophysistoxin-1 in *Dinophysis* spp. in association with the toxicity of scallops. In: T. Yasumoto, Y. Oshima and Y. Fukuyo (eds). *Harmful and Toxic Algal Blooms*, IOC of UNESCO, Paris, pp. 285-8.
- Sekiguchi, R., Suzuki, M., Takahashi, N., Yamamoto, M., Watai, M., Suzuki, T. and Yasumoto, T. (2006). Development of simple and rapid assays for diarrhetic shellfish toxins and yessotoxins based on enzyme inhibition and ELISA. 12th International Conference on Harmful Algae, Copenhagen, 4-8 September (2006), Programme and Abstracts, p.41.
- Shen, J.L., Ganzlin, G., Luckas, B. (1991). HPLC determination of DSP toxins. In: Freymy, J.M. (ed.). *Proceedings of Symposium on Marine Biotoxins*, Paris, France, Edition CNEVA, Maisons Alforts, ISBN 2-908473-02-X. pp 101-106.
- Shewstowsky, W. S Holmes C. F. B., Hu T., Marr J., Wright J.L.C., Chin J. and Sikorsku H. (1993). An anti-okadaic acid -anti -idiotypic antibody bearing an internal image of okadaic acid inhibits protein phosphatase PP1 and PP2A catalytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 193: 302-10.

Shumway, S. E. and Cembella, A.D. (1993). The impact of toxic algae on scallop culture and fisheries. *Rev. Fish. Sci.*, 1: 121-50.

Silvert, W.L. and Cembella, A.D. (1995). Dynamic modelling of phycotoxin kinetics in the blue mussel, *Mytilus edulis*, with implications for other marine invertebrates. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 521-31.

Simon, J. F. and Vernoux J.P. (1994). Highly sensitive assay of okadaic acid using protein phosphatase and paranitrophenyl phosphate. *Nat. Tox.*, 2: 293-301.

Stabell, O. B., Steffenak, I. and Aune, T. (1992). An evaluation of the mouse bioassay applied to extracts of diarrhetic shellfish toxins. *Food and Chemical Toxicology*, 30: 139-44.

Stobo, L. A., Lacaze Jpcl; Scott, A. C.; Gallacher, S.; Smith, E. A., and Quilliam, M. A.

(2005). Liquid Chromatography With Mass Spectrometry - Detection of Lipophilic Shellfish Toxins. *Journal of AOAC International*, 31; 88(5):1371-1382.

Subba Rao, D.V., Pan, Y., Zitko, V. and Mackeigan, K. (1993). Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) associated with a subsurface bloom of *Dinophysis norvegica* in Bedford Basin, Eastern Canada. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 97: 117-26.

Suganuma, M., Fujiki, H., Suguri, H., Yoshizawa, S., Hirota, M., Nakayasu, M., Ojiva, M., Wakamatsu, K., Yamada, K. and Sugimura, T. (1988). Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate 13-acetate-type tumor promotor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 1768-1771.

Sullivan, J.J. (1993). Methods of Analysis for Algal Toxins: Dinoflagellate and Diatom Toxins. In: *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Ian R.Falconer (ed.). Academic Press London: 29-48.

Suzuki, T., Yoshizawa, R. and Yamasaki, M. (1995). Diarrhetic Shellfish Toxins Determined by High-Performance Liquid Chromatography-Fluorometry in Mussels, *Mytilus corsicus*, from the Niigata Coast of Japan. *UJNR Technical Report*, 24: 97-100.

Suzuki, T., Mitsuya, T., Imai, M., Yamasaki, M., (1997). DSP toxin contents in *Dinophysis fortii* and scallops collected at Mutsu Bay, Japan. *J. Appl. Phycol.*, 8 (6): 509-515.

Suzuki, T., Mitsuya, T., Matsubara, H. and Yamasaki, M. (1998). Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate *Dinophysis fortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection. Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallops. *Journal of Chromatography A*, 815: 155-60.

Suzuki, T., Ota, H., and Yamasaki, M. (1999). Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon*, 37 (1): 187-198.

Suzuki, T. and Yasumoto, T. (2000). Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of the diarrhetic shellfish-poisoning toxins okadaic acid, dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-6 in bivalves. *Journal of Chromatography A*, 874: 199-206.

- Suzuki T. and Mitsuya T. (2001a). Comparison of dinophysistoxin-1 and esterified dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) contents in the scallop *Patinopecten yessoensis* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, 39: 905-8.
- Suzuki, T., MacKenzie, L., Stirling, D. and Adamson, J. (2001b). Pectenotoxin-2 seco acid: a toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand greenshell mussel, *Perna canaliculus*. *Toxicon*, 39: 507-14.
- Suzuki, T., Mackenzie, L., Stirling, D. and Adamson, J. (2001c). Conversion of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-2 seco acid in the New Zealand scallop, *Pecten novaezelandiae*. *Fisheries Science*, 67: 506-10.
- Suzuki, T., Beuzenberg, V., MacKenzie, L. and Quilliam, M.A. (2003). Liquid chromatography-mass spectrometry of spiroketal stereoisomers of pectenotoxins and the analysis of novel pectenotoxin isomers in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. *Journal of Chromatography, A*, 992: 141-50.
- Suzuki, T., Beuzenberg, V., MacKenzie, L. and Quilliam, M.A. (2004). Discovery of okadaic acid esters in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand using liquid chromatography-tandem/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18: 1131-1138.
- Svensson, S. (2003). Depuration of okadaic acid (diarrhetic shellfish toxin) in mussels, *Mytilus edulis* (Linnaeus), feeding on different quantities of nontoxic algae. *Aquaculture*, 218: 277-91.
- Takai, A. and Mieskes G. (1991). Inhibitory effect of okadaic acid on the p-nitrophenyl phosphate phosphatase activity on protein phosphatases. *Biochem. J.*, 275: 233-9.
- Tangen, K. (1983). Shellfish poisoning and the occurrence of potentially toxic dinoflagellates in Norwegian waters. *Sarsia*, 68: 1-7.
- Ten-Hage L., Delaunay N., Pichon V., Coute A., Puiseux-Dao S. and Turquet J. (2000). Okadaic acid production from the marine benthic dinoflagellate *Prorocentrum arenarium* Faust (dinophyceae) isolated from Europa island coral reef ecosystem (SW Indian Ocean)', *Toxicon*, 38: 1043-54.
- Terao, K., Ito, E., Yanagi, T. and Yasumoto, T. (1986). Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin 1 and pectenotoxin 1. *Toxicon*, 24: 1141-1151.
- Terao, K., Ito, E., Oarada, M., Murata, M. and Yasumoto, T. (1990). Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. The effects on mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon*, 28: 1095-104.
- Terao, K., Ito, E., Ohkusu, M. and Yasumoto, T. (1993). A comparative study of the effects of DSP-toxins on mice and rats. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (eds.). *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Elsevier, New York, pp. 581-6.

Tubaro, A., Florio, C., Luxich, E., Sosa, S., Della Loggia, R. and Yasumoto, T. (1996). A protein phosphatase 2a inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels. *Toxicon*, 34: 743-52.

Tubaro, A., Sidari, L., Della Loggia, R. and Yasumoto, T. (1998). Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from the northern Adriatic Sea. In: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández and T. Wyatt (eds). *Harmful Algae*, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 470-2.

Tubaro, A., Sosa, S., Altinier, G., Soranzo, M.R., Satake, M., Della Loggia, R. and Yasumoto, T. (2004 a). Short-term oral toxicity of homoyessotoxins, yessotoxin and okadaic acid in mice. *Toxicon*, 43: 439-445.

Tubaro, A., Sosa, S., Carbonato, M., Altinier, G., Vita, F., Melato, M., Satake, M. and Yasumoto, T. (2004 b). Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicon*, 41: 783-792.

Usagawa, T., Nishimura M., Itoh Y., Uda T. and Yasumoto T. (1989). Preparation of monoclonal antibodies against okadaic acid prepared from the sponge *Halicondria okadai*. *Toxicon*, 27: 1323-30.

Vale, P. and Sampayo, M.A. (1996). DTX-2 in Portuguese bivalves. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., and Fukuyo, Y. (eds.). *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC of UNESCO Publishers, pp. 539-542.

Vale, P., Sampayo, M.A.de M. and Quilliam, M. (1998). DSP complex toxin profiles in relation with *Dinophysis* spp occurrence and domoic acid confirmation by LC-MS in Portuguese bivalves. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., and Wyatt, T. (eds.). *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers, pp. 503-506.

Vale, P. and Sampayo, M.A. de M. (1999). Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon*, 37: 1109-21.

Vale P. and Sampayo M.A. de M. (2000). Dinophysistoxin-2: a rare diarrhoeic toxin associated with *Dinophysis acuta*. *Toxicon*, 38: 1599-606.

Vale P. and Sampayo M.A.de M. (2002a). Pectenotoxin-2 seco acid, 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid and pectenotoxin-2 in shellfish and plankton from Portugal. *Toxicon*, 40: 989-96.

Vale, P. and Sampayo, M.A. de M. (2002b). Esterification of DSP toxins by Portuguese bivalves from the northwest coast determined by LC-MS- a widespread phenomenon. *Toxicon*, 40: 33-42.

Vale, P. and Sampayo, M.A. de M. (2002c). First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro Lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton. *Toxicon*, 40: 989-96.

- Vale, P. and Sampayo, M.A. de M. (2002d). Dinophysistoxin-2: a rare diarrhoeic toxin associated with *Dinophysis acuta*. *Toxicon*, 38: 1599-1606.
- Vieytes, M. R., Fontal, O., Leira, F., Vieites Baptista de Sousa, J. M. and Botana, L. (1997). A fluorescent microplate assay for diarrhetic shellfish toxins. *Analytical Biochemistry*, 248: 258-64.
- Whyte, J.N.C., Ginther, N.G. and Townsend, T.D. (1995). Accumulation and depuration of domoic acid by the mussel, *Mytilus californianus*. In: P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien and C. Marcaillou (eds.). *Harmful Marine Algal Blooms*, Lavoisier, Intercept Ltd, Paris, pp. 531-7.
- Wilkins, A.L., Rehmann, N., Torgersen, T., Rundberget, T., Keogh, M., Petersen, D., Hess, P., Rise, F. and Miles, C.O. (2006). Identification of fatty acid esters of pectenotoxin-2 seco acid in blue mussels (*Mytilus edulis*) from Ireland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 5672-5678.
- Windust, A., J., Quilliam, M.A., Wright, J.L.C. and McLachlan, J.L. (1997). Comparative toxicity of the diarrhetic shellfish poisons, okadaic acid, okadaic acid diol-ester and dinophysistoxin-4, to the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Toxicon*, 35: 1591-603.
- Windust, A.J., Hu, T.M., Wright, J.L.C., Quilliam, M.A. and McLachlan, J.L. (2000). Oxidative metabolism by *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) of a diol-ester of okadaic acid, the diarrhetic shellfish poisoning. *Journal of Phycology*, 36: 342-50.
- Wohlgelassen, G.D., Mann, K.H., Subba Rao, D.V. and Pocklington, R. (1992). Dynamics of the phycotoxin domoic acid: accumulation and excretion in two commercially important bivalves. *J. Appl. Phycol.*, 4: 297-310.
- Yasumoto, T., Oshima, Y. and Yamaguchi, M. (1978). Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 44: 1249-55.
- Yasumoto, T., Oshima, Y. and Yamaguchi, M. (1979). Occurrence of a new type of toxic shellfish in Japan and chemical properties of the toxin. In: D.L. Taylor and H.W. Seliger (eds.). *Toxic dinoflagellate blooms*, Elsevier, New York, pp. 395-8.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarashi, T. and Fujita, N. (1980 a). Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 46: 1405-11.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Murakami, Y., Nakajima, I., Bagnis, R., Fukuyo, Y. (1980 b). Toxicity of benthic dinoflagellates found in coral reef. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 46(3): 327-331.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Matsumoto, G.K. and Clardy, J. (1984). Diarrhetic Shellfish Poisoning. In: E.P. Ragelis (ed.). *Seafood toxins*, ACS Symposium Series 269, Washington D.C., pp. 207-14.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G. K. and Clardy, J. (1985 a). Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*, 41: 1019-25.

Yasumoto, T. (1985 b). Recent progress in the chemistry of dinoflagellate toxins. In: D.M. Anderson, A.D. Cembella and G.M. Hallegraeff (eds). *Physiological ecology of harmful algal blooms*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 259-70.

Yasumoto, Y., Seino, N., Murakami, Y. and Murata, M. (1987). Toxins produced by benthic dinoflagellates. *Biological Bulletin*, 172: 128-31

Yasumoto, T., Murata, T., Lee, J.S., Torigoe, K. (1989). Polyether toxins produced by dinoflagellates. In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. (eds). *Mycotoxins and Phycotoxins*, Elsevier, Amsterdam, pp. 375-382.

Yasumoto, T. (1990). Recent progress in the chemistry of dinoflagellate toxins. In: E. Granéli, E.B. Sündström, L. Edler and D.M. Anderson (eds). *Toxic Marine Phytoplankton*, Elsevier, New York, pp. 259-70.

Yasumoto, T., Fukui, M., Sasaki, K. and Sugiyama, K. (1995). Determinations of marine toxins in foods. *J. AOAC International*, 78: 574-82.

Yasumoto, T. and Takizawa, A. (1997). Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by high-pressure liquid chromatography. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61: 1775-7.

Yuzao, Q., Ziaping, Z., Ying, H., Songhui, L., Congju, Z. and Yaquing, L. (1993). Occurrence of red tides on the coast of China. In: T.J. Smaayda and Y. Shimizu (eds). *Toxic phytoplankton blooms in the sea*, Elsevier Science, New York, USA, pp. 43-6.

Zhao, J., Lembeye, G., Cenci, G., Wall, B. and Yasumoto, T. (1993). Determination of okadaic acid and dinophysistoxin-1 in mussels from Chile, Italy and Ireland. In: T.J. Smaayda and Y. Shimizu (eds). *Toxic phytoplankton blooms in the sea*, Elsevier Science, New York, USA, pp. 587-92.

Zhou, J. and Fritz, L. (1994). Okadaic acid antibody localizes to chloroplasts in the DSP-toxin-producing dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum maculosum*. *Phycologia*, 33: 455-61.

Zhou, M., Li, J., Luckas, B., Yu, R., Yan, T., Hummert, C. and Kastrup, S. (1999). A recent shellfish toxin investigation in China. *Marine Pollution Bulletin*, 39: 331-4.

